

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**ESTUDIO SOBRE EL PAPEL DE LA VÍA DEL RECEPTOR
TLR-4 EN LA NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR
ESTRÉS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Iciar Gárate Pérez

Bajo la dirección de los doctores

Juan Carlos Leza Cerro
José Luis Muñoz Madrigal
Borja García Bueno

Madrid, 2012

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



Estudio sobre el papel de la vía del receptor TLR-4 en la neuroinflamación inducida por estrés.

Tesis Doctoral

Abril 2012

Iciar Gárate Pérez

Directores

Dr. Juan Carlos Leza Cerro

Dr. José Luis Muñoz Madrigal

Dr. Borja García Bueno

I. INTRODUCCIÓN**1****1. EL ESTRÉS: GENERALIDADES**

1.1. DEFINICIÓN	2
1.2. RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS	3
1.3. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL ESTRÉS	5
1.3.1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA)	5
1.3.2. Las “hormonas del estrés”	7

2. FISIOPATOLOGÍA DE LOS CAMBIOS CEREBRALES INDUCIDOS POR ESTRÉS

2.1. PAPEL DE LOS MEDIADORES DEL ESTRÉS	9
2.1.1. Glucocorticoides	9
2.1.2. Catecolaminas	12
2.1.3. Aminoácidos excitadores	12
2.2. ESTRÉS Y NEUROINFLAMACIÓN	14
2.2.1. Citoquinas	16
2.2.2. Factor Nuclear de transcripción <i>kappa</i> B (NF- κ B)	18
2.2.3. Enzimas dependientes de NF- κ B	19
2.2.4. Mediadores antiinflamatorios	21

3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ESTRÉS

3.1. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ESTRÉS	25
3.2. PATOLOGÍAS DEL SNC ASOCIADAS AL ESTRÉS	26
3.2.1. Enfermedades neurodegenerativas	26
3.2.2. Enfermedades psiquiátricas	29

4. RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR-4)

4.1. GENERALIDADES	33
4.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TLR-4	35
4.2.1. Vía dependiente de MyD88	36
4.2.2. Otras vías de señalización	37
4.3. TLR-4 EN EL SNC	39

5. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	40
5.1.1. Relación entre comportamiento y sistema inmune	40
5.1.2. Traslocación bacteriana intestinal	41
5.1.3. TLR-4 y estrés	43
5.1.4. Justificación del estudio	44

5.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
6. ENGLISH SUMMARY	48
II. MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. MODELOS ANIMALES	
1.1. ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN EN RATA	55
1.1.1. Animales	55
1.1.2. Protocolo de estrés agudo	55
1.1.3. Grupos experimentales	57
1.2. ESTRÉS SUBCRÓNICO EN RATÓN	59
1.2.1. Animales	59
1.2.2. Protocolo de estrés subcrónico	60
1.2.3. Grupos experimentales	61
1.3. ESTRÉS CRÓNICO EN RATA, “ <i>CHRONIC MILD STRESS</i> ” (CMS)	63
1.3.1. Animales	63
1.3.2. Protocolo de estrés crónico	63
1.3.3. Grupos experimentales	65
2. TOMA DE MUESTRAS	
2.1. EXTRACCIÓN DE TEJIDO FRESCO	66
2.2. EXTRACCIÓN DE TEJIDO FIJADO	67
3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	
3.1. PROCESAMIENTO DE TEJIDO FRESCO	68
3.1.1. Microbiología	68
3.1.2. Obtención de extracto nuclear y citosólico	69
3.2. TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOQUÍMICAS	70
3.2.1. Corticosterona plasmática	70
3.2.2. Cuantificación proteica	70
3.2.3. Western blot	71
3.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	72
3.2.5. Medidas de LBP y LPS plasmáticos	75
3.2.6. Actividad transcripcional de NF- κ B (subunidad p65)	75
3.2.7. Medición de prostaglandinas en corteza prefrontal	76
3.2.8. Peroxidación lipídica en corteza prefrontal	78
3.2.9. Medición de nitritos en corteza prefrontal	78
3.2.10. Determinación de inmunoglobulina A en colon	78

3.2. INMUNOFLUORESCENCIA	79
4. CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL	80
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81

III. RESULTADOS 82

1. ACUTE RESTRAINT-STRESS IN RAT

1.1. ROLE OF THE TLR-4 PATHWAY IN THE TIME COURSE OF THE STRESS RESPONSE	83
1.1.1. Pro-inflammatory parameters in prefrontal cortex	83
1.1.2. TLR-4 pathway parameters in plasma and prefrontal cortex	84
1.2. THE ROLE OF TLR-4 PATHWAY IN HPA ACTIVATION	85
1.2.1. Plasma corticosterone levels after 6 hours of stress exposure	85
1.2.2. Time course of plasma corticosterone during the restraint stress	86
1.3. ROLE OF TLR-4 PATHWAY IN THE NEUROINFLAMMATION PRODUCED BY STRESS EXPOSURE IN RAT PREFRONTAL CORTEX	87
1.4. EFFECTS OF TAK-242 IN TLR-4 UP-REGULATION AND SIGNALLING AFTER STRESS EXPOSURE	89
1.5. POSSIBLE ORIGIN OF TLR-4 ACTIVATION IN BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER STRESS	91

2. SUBCHRONIC RESTRAINT-STRESS IN MICE

2.1. OXIDATIVE/NITROSATIVE ENZYMES IN PREFRONTAL CORTEX AFTER LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION	92
2.2. TLR-4 EXPRESSION AND SIGNALLING IN PREFRONTAL CORTEX AFTER STRESS IN HeN AND HeJ MICE	93
2.3. CELLULAR TYPES DISPLAYING TLR-4 IMMUNOREACTIVITY IN THE PREFRONTAL CONTEX OF HeN MICE	94
2.4. POSSIBLE REGULATORY MECHANISMS OF TLR-4 ACTIVATION IN BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER STRESS	96
2.5. EFFECT OF INTESTINAL DECONTAMINATION ON STRESS-INDUCED TLR-4 ACTIVATION IN HeN MICE	99
2.6. ROLE OF TLR-4 IN THE NEUROINFLAMMATION PRODUCED BY STRESS EXPOSURE IN MICE BRAIN CORTEX	101
2.7. INTESTINAL DECONTAMINATION EFFECT ON STRESS-INDUCED NEUROINFLAMMATION IN HeN MICE	105
2.8. ROLE OF TLR-4 IN THE HPA AXIS ACTIVATION ELICITED BY STRESS EXPOSURE	107

3. CHRONIC MILD STRESS IN RATS

3.1. TLR-4 EXPRESSION AND SIGNALLING IN THE BRAIN PREFRONTAL CORTEX	108
3.2. POSSIBLE REGULATORY MECHANISM OF TLR-4 ACTIVATION IN THE BRAIN CORTEX	109
3.3. INFLAMMATORY MEDIATORS IN THE BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER CMS EXPOSURE	109
3.4. OXIDATIVE/NITROSATIVE DAMAGE IN THE BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER CMS EXPOSURE	111
3.5. EFFECTS OF INTESTINAL DECONTAMINATION ON CMS-INDUCED INFLAMMATORY AND OXIDATIVE/NITROSATIVE DAMAGE IN BRAIN	112
3.6. EFFECTS OF CMS AND INTESTINAL DECONTAMINATION ON THE PLASMA CORTICOSTERONE LEVELS	115
3.7. EFFECTS OF CMS AND INTESTINAL DECONTAMINATION ON THE DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOUR	115

IV. DISCUSIÓN

118

1. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: ESTUDIO FARMACOLÓGICO	119
2. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE	123
3. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: IMPLICACIONES TRASLACIONALES	128
4. DISCUSIÓN GLOBAL	132

V. CONCLUSIONES

135

1. CONCLUSIONES	136
2. CONCLUSIONS (English version)	136

BIBLIOGRAFÍA	138
--------------------	-----

5-HT: Serotonina	MDA: Malonildialdehído
AA: Ácido araquidónico	MD-2: <i>Myeloid differentiation 2 or lymphocyte antigen 96</i>
ACTH: Hormona adrenocorticotropa	MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
AINES: Antiinflamatorios no-esteroides	MMP: Metaloproteasa de matriz
AP-1: Proteína activadora-1	MR: Receptores de mineralocorticoides
ATB: Antibiótico	mRNA: RNA mensajero
ATP: Trifosfato de adenosina	MSH: Hormona estimuladora de los melanocitos
AVP: Vasopresina	MyD88: <i>Myeloid differentiation 88</i>
BHE: Barrera hematoencefálica	NA: Noradrenalina
CD14: <i>Cluster of differentiation 14</i>	NF- κ B: Factor nuclear kappa B
COX: Ciclooxygenasa	NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico
CRH: Hormona liberadora de corticotropina	NO: Óxido nítrico
DAMPs: <i>Danger-associated molecular pattern molecules</i>	NOS: Óxido nítrico sintasa
DEPC: Dietil-piromcarbonato	PAMPs: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PBS: Tampón fosfato salino
dNTP: Deoxinucleótidos trifostato	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
EA: Enfermedad de Alzheimer	PET: Tomografía de emisión de positrones
EAAT: Transportadores de aminoácidos excitatorios	PLA: Fosfolipasa A
EAE: Encefalomiелitis alérgica experimental	PG: Prostaglandina
EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético	POMC: Proopiomelanocortina
EIA: Método inmuno-enzimático de adsorción	PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisoma.
ELISA: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	PPRE: Elementos de respuesta a PPAR
EM: Esclerosis múltiple	PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares	RNA: Ácido ribonucleico
GC: Glucocorticoides	ROS: Especies reactivas de oxígeno
GLUT: Transportadores de glucosa	SEM/EEM: <i>Standard error of the mean</i> o error estándar de la media
GR: Receptor de glucocorticoides	SEPT: Síndrome de estrés postraumático
GRAM +/-: Gram positivo/negativo	SMA: Sistema hormonal-meduloadrenal
HPA: Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal	SNA: Sistema nervioso autónomo
HSP: <i>Heat shock proteins</i>	SNC: Sistema nervioso central
I&ND: Teoría Inflamatoria y Neurodegenerativa de la depresión	SNS: Sistema nervioso simpático
IgA: Inmunoglobulina A	STAT: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
I κ B: Inhibidor de kappa B	TAB: Proteína unida a TAK
IKK: Quinasa de I κ B	TACE: Enzima convertidora de TNF
IFN: Interferón	TAK: Quinasa asociada a TGF α
IL: Interleuquina	TBS: Tampón Tris salino
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible	TCA: Ácido tricloroacético
i.p.: Intraperitoneal	TIR: Toll/IL-1R
i.v.: Intravenoso	TLR: <i>Toll-like Receptor</i>
IRAK: Quinasa asociada a interleuquina1	TNF: Factor de Necrosis Tumoral
IRF: Factor de regulación del interferón	TNF-R: Receptor de TNF
JNK: Quinasa C-jun del extremo N-terminal	TRAF: Factor asociado al TNF-R
LBP: <i>LPS binding protein</i>	TRAM: Molécula asociada al receptor toll
LPS: Lipopolisacárido	TRIF: Activador de interferón asociado al receptor Toll
LRR: Repeticiones ricas en leucinas	TX: Tromboxano
MAPK: Proteinquinasa activada por mitógenos	WB: <i>Western blot</i>
MC: Mineralocorticoides	WT: <i>Wild-type</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ESTRÉS: GENERALIDADES

2. FISIOPATOLOGÍA DE LOS CAMBIOS CEREBRALES INDUCIDOS POR ESTRÉS

3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ESTRÉS

4. RECEPTOR TOLL-LIKE 4

5. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6. ENGLISH SUMMARY

1. EL ESTRÉS: GENERALIDADES

1.1. DEFINICIÓN

La palabra “estrés” es una adaptación al castellano de la palabra inglesa *stress* que se traduce como tensión. Fue utilizada por primera vez en el S. XVII por Robert Hooke en el estudio de las características físicas de los cuerpos sólidos. En la primera mitad del S. XX pasó del campo de la física al de la biomedicina gracias a Hans Selye. En uno de sus primeros trabajos Selye describió el Síndrome General de Adaptación (Selye, 1936), donde expone la respuesta fisiológica característica a un estímulo estresante. El nombre se debe a que parece tratarse de un estado en el que el organismo hace un esfuerzo por adaptarse a una nueva situación.

Otro pionero en la investigación sobre el estrés fue Walter Cannon que influyó a Selye con su hipótesis de la **homeostasis** (equilibrio dinámico en el que los componentes del organismo están en constante cambio para mantenerlo en una condición estable y constante dentro de unos márgenes). También contribuyó de manera notable a sentar las bases del estrés con su aportación del concepto “lucha o huida” (*fight or flight*) que describe la respuesta de los organismos frente a estímulos amenazantes.

Según el diccionario de la Real Academia Española, en el campo de la Medicina el estrés se define como: “Tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicosomáticas o trastornos psicológicos a veces graves”. Sin embargo, la comunidad científica sigue sin una definición consensuada de estrés. Las ideas más aceptadas describen el estrés como una situación en la que la homeostasis está comprometida, una definición que refleja esta idea es la siguiente: “El estrés puede ser definido como una amenaza real o imaginaria a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo, que produce una respuesta psicológica y/o comportamental. En biomedicina, el estrés también se refiere a situaciones en las cuales los glucocorticoides de origen adrenal y las catecolaminas se encuentran elevados como consecuencia de una experiencia” (McEwen, 2000).

Probablemente no exista una definición consensuada de estrés por tratarse de un concepto multidimensional compuesto por varios elementos (Levine y Ursin, 1991): un estímulo inicial o estímulo estresante, el procesamiento del estímulo por el sistema nervioso y la respuesta de salida o respuesta a estrés. La mayor dificultad es que estos tres elementos interaccionan.

El estímulo estresante se puede clasificar como agudo, episódico o subagudo y repetido o crónico en función de su duración (Black y Garbutt, 2002).

Es importante indicar que no todos los estados de estrés son necesariamente negativos o nocivos. Experiencias que generan estrés de forma leve, breve o controlable pueden ser percibidas como placenteras y excitantes y contribuyen al desarrollo intelectual y emocional del individuo (eustress) (Tafet y Bernardini, 2003). Por el contrario, cuando el estrés es de intensidad mayor, persistente y de amenaza no controlable, produce respuestas adaptativas deficientes (distress) que pueden desembocar en la generación de numerosas patologías (Selye, 1976).

1.2. RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS

La primera descripción de la respuesta a estrés la realizó Hans Selye denominándola Síndrome General de Adaptación, y se trata de la reacción constituida por la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y del sistema nervioso simpático tras un estímulo estresante (Selye, 1936).

La respuesta descrita en este síndrome consta de tres fases distintas (Figura 1):

- Fase de alarma: En esta primera etapa la médula adrenal genera adrenalina y la corteza adrenal glucocorticoides con el fin de restablecer la homeostasis. Es la primera reacción del organismo frente a una exposición repentina a estímulos para los que no está adaptado.
- Fase de resistencia: Los sistemas de defensa y adaptación frente al estímulo estresante son óptimos y sostenidos. Se caracteriza por un aumento de la resistencia al estímulo estresante que ha causado la respuesta y una menor resistencia a otros estímulos.
- Fase de agotamiento: Cuando el estímulo persiste se alcanza esta fase en la que la respuesta adaptativa cesa y como consecuencia reaparecen síntomas característicos de la fase de alarma, lo que puede desembocar en enfermedad e incluso en la muerte del organismo.

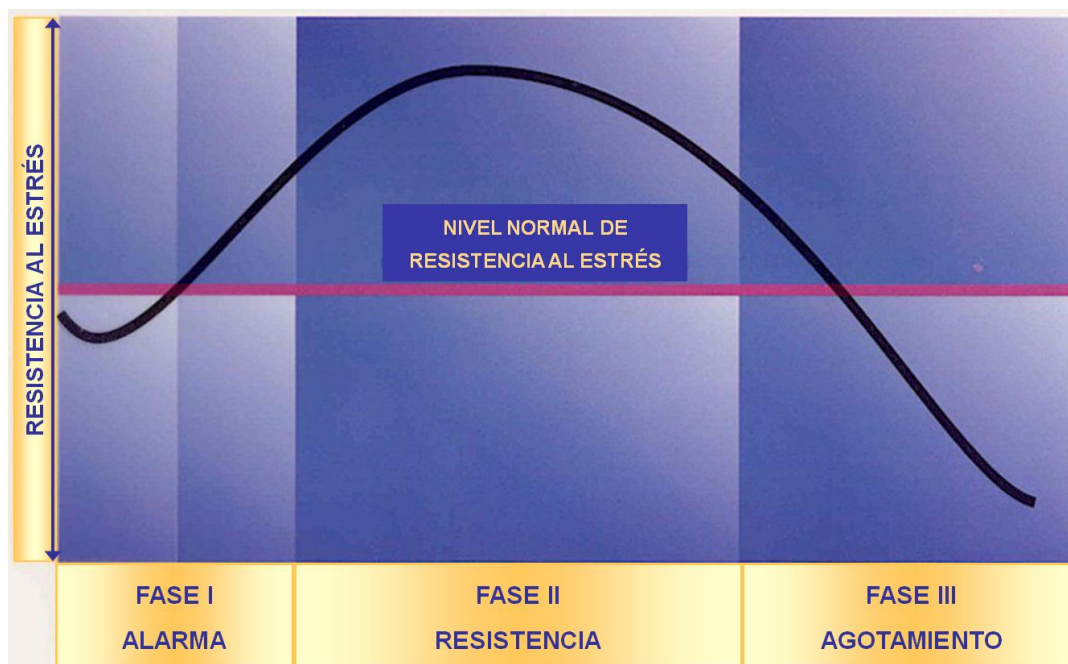


Figura 1. Esquema de las fases del Síndrome General de Adaptación (Selye 1936).

La respuesta al estrés es necesaria para garantizar la supervivencia del individuo en condiciones desfavorables, al fomentar un mayor aprovechamiento de los recursos. Dentro del contexto de lucha o huida, el estímulo estresante desencadena un incremento del estado de alerta que permite detectar la presencia de un peligro. A continuación se produce una respuesta fisiológica variada compuesta por:

- Aumento de la frecuencia y la fuerza de contracción del corazón y de la presión sanguínea,
- Redirección del flujo sanguíneo al músculo esquelético,
- Aumento de la capacidad respiratoria y broncodilatación,
- Supresión de funciones “no-esenciales”, como la digestión, el crecimiento y la reproducción.

En definitiva, se trata de dirigir la energía disponible para enfrentarse a la amenaza o huir de ésta y evitar pérdidas energéticas en funciones no esenciales en este tipo de situaciones (rev. en Sapolsky, 1998).

En la actualidad, existen evidencias científicas que discuten ciertos aspectos de la teoría de Selye. No todos los estímulos estresantes provocan la misma respuesta estereotipada de adaptación en todos los organismos. De hecho, el eje HPA y los nervios adrenérgicos o noradrenérgicos tienen diferentes patrones de respuesta en relación con el tipo de estímulo estresante (Goldstein y McEwen, 2002). Además, la respuesta “lucha-huida” no se realiza de la misma manera en los dos sexos, sino que

se refiere más bien a la realizada por individuos de sexo masculino, mientras que la de individuos de sexo femenino se parece más al tipo “protección-hacerse amigo de” (“tend-befriend”) (Taylor et al., 2000). Estas diferencias no sólo atienden a distintas percepciones y respuestas comportamentales frente al mismo agente estresante, sino a diferencias fisiológicas en la regulación de los mediadores del estrés (Wood y Shors, 1998).

La tercera fase, o de agotamiento, del modelo del Síndrome General de Adaptación al estrés propuesto por Selye, ha sido revisada en relación con la posibilidad de que los mediadores de estrés pueden ser dañinos o protectores en función de su curso temporal de secreción. De hecho, los mismos mediadores de estrés que permiten la resistencia y el fenómeno de adaptación pueden, si el estímulo estresante persiste, producir el agotamiento de la respuesta y resultar al final dañinos para el organismo.

Para solucionar estas posibles ambigüedades, algunos autores han creado una nueva terminología en la que definen **alostasis** como el sistema ordenado que conduce a la estabilidad mediante cambios controlados en ciertos mediadores (hormonas del eje HPA o ciertas citoquinas, por ejemplo) (McEwen, 2005). Se conoce con el término “carga alostática” a la modificación continua de mediadores (glucocorticoides) que puede mantenerse durante un periodo de tiempo indefinido (dentro de unos límites compatibles con la vida del organismo) y que es variable de unos individuos u organismos a otros, permitiendo la adaptación a distintos agentes estresantes (cambios ambientales, sociales, patológicos, predadores, contaminación, etc.).

Si la carga alostática persiste en el tiempo de manera crónica, o no es eficiente para mantener la adaptación y supervivencia, aparece el fenómeno conocido como sobrecarga alostática, fenómeno que predispone al organismo frente a la enfermedad y en última instancia, a la muerte por agotamiento.

1.3. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL ESTRÉS

1.3.1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA)

La respuesta al estrés comienza en la corteza sensorial del cerebro que capta los estímulos estresantes percibidos a través de los sistemas sensoriales específicos. Desde aquí la información alcanza varias regiones del cerebro donde será procesada.

Algunas de estas regiones, en especial las cortezas cingulada y prefrontal, pero también la amígdala o el hipocampo, están implicadas en la respuesta al estrés y actúan activando o inhibiendo las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

Cuando las neuronas parvocelulares se activan, secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde la eminencia media del hipotálamo al sistema venoso portal. La CRH alcanza la región anterior de la hipófisis, también llamada adenohipófisis o pituitaria (Rock et al., 1984; Dunn y Berridge, 1990), donde regula la expresión de proopiomelanocortina (POMC), macropéptido precursor que será procesado para dar lugar a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), a beta-endorfina y a la hormona estimuladora de melanocitos α (α MSH) (Lightman y Young, 1988).

Las neuronas parvocelulares también liberan arginina-vasopresina (AVP) (Whitnall, 1993), que igualmente estimula la liberación de ACTH, sin afectar a su síntesis.

La ACTH en el torrente sanguíneo se transporta hasta alcanzar las glándulas adrenales donde actúa sobre las zonas *fasciculata* y *reticularis* de la corteza adrenal, para sintetizar glucocorticoides y secretarlos (GC) a la circulación sistémica (Axelrod y Reisine, 1984) (Figura 2).

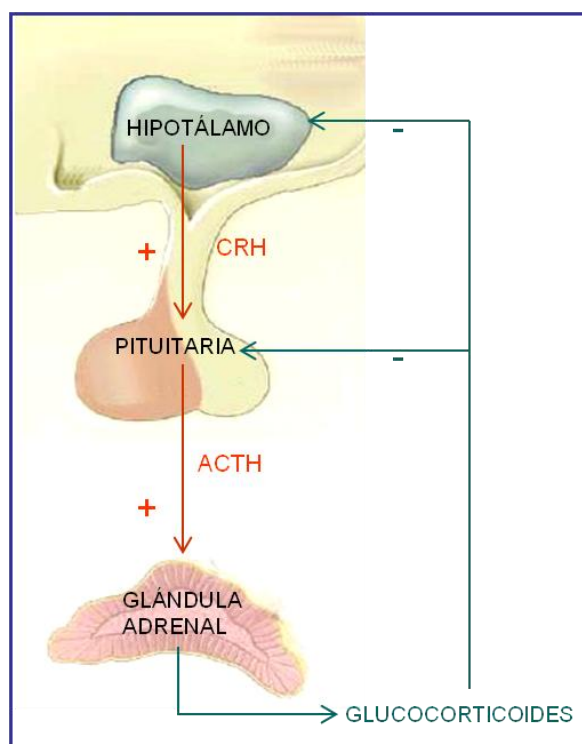


Figura 2. Representación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal y de su regulación por retroalimentación negativa.

Los niveles elevados de GC mantenidos pueden ser perjudiciales, por lo que es importante controlar su liberación. El eje HPA se autorregula mediante retroalimentación (o *feedback*) negativa, de forma que niveles elevados de GC inhiben la secreción de CRH y ACTH en el hipotálamo y la pituitaria, respectivamente.

1.3.2. Las “hormonas del estrés”

- Glucocorticoides

En humanos el cortisol es el principal GC y en roedores es la corticosterona. Los GC, junto con los mineralocorticoides (como la aldosterona) se liberan por acción de la ACTH sobre las glándulas adrenales; ambas son hormonas de naturaleza esteroidea.

Existen dos tipos de receptores intracelulares para corticoides: receptor de mineralocorticoides (MR) o de tipo I, y de glucocorticoides (GR) o de tipo II (Reul y de Kloet, 1985). La presencia de MR en cerebro se conoce desde finales de los años 60 (McEwen et al., 1968), estos receptores son de alta afinidad y se saturan a niveles basales de corticosteroides, se considera que se ocupan de la regulación de las fluctuaciones circadianas de estas hormonas. Los receptores GR tienen menos afinidad pero son muy reactivos a los cambios de concentración de glucocorticoides. Los MR regulan la actividad del eje de forma tónica, mientras que en situaciones de estrés los GR parecen tener un papel más importante. Así parecen complementarse ambos tipos de receptores modulando las respuestas del eje HPA.

La densidad de receptores para GC en el cerebro varía en función del ritmo circadiano, de la edad y del estrés agudo o crónico sufrido durante la vida del individuo (Spencer et al., 1990; Van Eekelen et al., 1992; Meyer et al., 2001).

En general, los receptores GR se expresan en mayor medida que los MR, sobre todo en ciertas regiones como la pituitaria, hipocampo, *septum*, núcleo paraventricular del hipotálamo y núcleo supraóptico (Alexis et al., 1982; Tornello et al., 1982; Sawchenko, 1987).

- Catecolaminas

En la respuesta inicial (los primeros segundos) a un estímulo estresante se liberan catecolaminas: adrenalina, noradrenalina y dopamina (rev en Stratakis y Chrousos, 1995). Existen tres sistemas catecolaminérgicos periféricos: sistema nervioso simpático (SNS), sistema hormonal-meduloadrenal (SMA) y sistema autocrino/paracrino dopa-dopamina, cada uno de los cuales con sus propios efectores, sistemas de regulación y función. En contra de lo que se pensaba, no todas las formas de estrés conducen a una respuesta estereotipada, sino que en función del tipo y la intensidad del estímulo estresante se darán diferentes respuestas del SNS y del SMA.

Además, hay que destacar que estos sistemas tienen una función tónica independiente de la percepción de estrés o de situaciones de emergencia. De este modo, el SNS regula procesos normales en los organismos como la ortostasis, locomoción o digestión.

– Sistema Nervioso Simpático: En una situación estresante se estimula la rama simpática del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) (rev. en Valentino et al., 1993). Esta activación consiste en la excitación, desde el hipotálamo, de neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal, así se activan las vías autónomas descendentes. La estimulación de las vías descendentes induce la secreción de Noradrenalina (NA) en los órganos inervados, y la activación de los distintos receptores adrenérgicos (asociados a proteínas G) que se dividen en dos grupos: α y β adrenérgicos. La activación de receptores β 1-adrenérgicos presentes en el músculo cardíaco produce un aumento en la fuerza de contracción y de la frecuencia cardíaca, y una vasodilatación de las arteriolas coronarias. Además, se genera una relajación de la musculatura bronquial, incremento de la frecuencia respiratoria y, por lo tanto, un mayor aporte de oxígeno a la sangre. Por otro lado, la activación α -adrenérgica produce una contracción en los vasos que riegan los órganos y tejidos no necesarios para la respuesta a estrés (aparato reproductor o digestivo), y facilita la circulación hacia los órganos necesarios (cerebro, músculo). Además, el SNS modifica el metabolismo del organismo estresado, estimulando la glucogenolisis hepática que proporciona un mayor aporte de glucosa en los tejidos que la demandan, como el cerebral (Vingerhoets, 1985).

– Sistema hormonal Medulo-Adrenal: Las neuronas preganglionares simpáticas también pueden producir la activación de las células de la médula adrenal cuando se detecta una señal estimuladora. Estas células adrenomedulares sintetizan

principalmente adrenalina y noradrenalina (NA) en menor grado, que son liberadas a la circulación sanguínea y se unen a sus receptores en los tejidos diana.

– Sistema Autocrino/Paracrino Dopa-Dopamina: La dopamina se libera de la médula adrenal (junto con la adrenalina), de los nervios dopaminérgicos y de los órganos mesentéricos (Goldstein, 1995).

La respuesta al estrés que se acaba de describir, pese a ser altamente adaptativa, puede llegar a ser dañina. Como ya se ha indicado, no todos los estados de estrés son negativos (eustress), pero cuando el estrés es de una intensidad mayor, persistente y no controlable, puede producir respuestas adaptativas deficientes (distress) que pueden desembocar en la generación de daño, e incluso, numerosas patologías (Selye, 1976).

2. FISIOPATOLOGÍA DE LOS CAMBIOS CEREBRALES INDUCIDOS POR ESTRÉS

2.1. PAPEL DE LOS MEDIADORES DEL ESTRÉS

Existe una gran variedad de mediadores que intervienen en la respuesta al estrés: hormonas del eje hipotálamo-pituitario, hormonas tiroideas, mediadores gastrointestinales, péptidos opiodes, etc. A continuación, se exponen los mediadores más importantes en el Sistema Nervioso Central.

2.1.1. Glucocorticoides

Como se describe en el apartado anterior, durante la exposición a un estímulo estresante se liberan grandes cantidades de GC. Los GC son conocidos por sus acciones antiinflamatorias en la periferia, sin embargo, tras la exposición a estrés, a pesar de los niveles elevados de GC, se puede describir un estado de inflamación en el SNC (Sorrells y Sapolsky, 2007). Esta contradicción se conoce como **paradoja glucocorticoidea**.

La visión clásica del papel de los GC, les otorga una función únicamente inmunosupresora y antiinflamatoria. Esto explicaría su liberación durante los procesos

inflamatorios (alergias, enfermedades autoinmunes, sepsis, etc.) como el mecanismo que permite que se limite y resuelva el proceso proinflamatorio; de hecho, es el tratamiento indicado para muchas enfermedades que cursan con inflamación. Su papel inmunosupresor se basa en la capacidad de los GC de inhibir la respuesta inmune adquirida, a través de la supresión de varios procesos como el de adhesión y migración celular, la activación de macrófagos, la presentación de antígenos y la activación, proliferación, diferenciación y maduración de linfocitos T, así como la función de los linfocitos B de producir anticuerpos (rev. Sorrells y Sapolsky, 2007).

La acción antiinflamatoria de los GC se basa fundamentalmente en la capacidad de bloquear la vía proinflamatoria al inhibir la activación del Factor nuclear de transcripción *kappa* B (NF- κ B) de dos maneras diferentes, la primera, aumentando la expresión de proteínas inhibitorias del NF- κ B y la segunda, bloqueando su unión al DNA al interaccionar GR con la subunidad p65 de NF- κ B (De Bosscher et al., 2000; 2003).

En el estrés crónico, se demostró un estado de inmunosupresión mediado por la liberación constante de GC. Sin embargo, durante el estrés, agudo y crónico, se liberan otros mediadores que afectan a la función inmune, por lo que el efecto de los GC no es idéntico al efecto del estrés. Se ha observado que en las fases tempranas del estrés se da un aumento de la respuesta inmune en el organismo (Herbert y Cohen, 1993b), no sólo mediada por catecolaminas, como veremos más adelante, también inducido por GC. La cuestión de cómo los GC pueden tanto activar como inhibir el sistema inmune no tiene una respuesta fácil. Así, se ha confirmado que el papel concreto de los GC en estrés dependerá de la dosis, el tiempo de exposición y el tipo de receptor (rev en Sorrells y Sapolsky, 2007).

El papel de los GC en el SNC revela otra faceta de la paradoja glucocorticoidea. La neuroinflamación observada en estrés se debe a que los GC tienen una gran variedad de efectos en el cerebro, distintos a los que tienen en el resto del organismo. Por ejemplo, las células del hipocampo expresan niveles elevados de GR y MR y son una de las primeras dianas de las acciones de los GC. Al unirse a los receptores MR del hipocampo, los GC actúan sobre funciones fisiológicas. En la fase temprana de la respuesta a estrés se observa un pequeño incremento en la ocupación de GR. Se produce un efecto bifásico: mientras los niveles de GC no aumenten en exceso, previenen la muerte neuronal en el giro dentado, aumentan la plasticidad sináptica y mejoran el aprendizaje mediado por el hipocampo. Sin embargo, una exposición prolongada a niveles elevados de GC tiene efectos deletéreos mediados por la alta ocupación de los GR (Pavlidis et al., 1996).

La hipótesis de la cascada de GC propone que el daño hipocampal, que da lugar a la regulación a la baja de los GR en las neuronas hipocampales, conlleva un fallo en el control del *feedback* negativo del eje HPA. La consecuencia de tal fallo sería la elevación a largo plazo de los niveles de corticosteroides (Sapolsky et al., 1986) que, como se ha mencionado, resulta perjudicial para estas neuronas, produciendo alteración cognitiva, alteración en la plasticidad neuronal, inhibición de la neurogénesis, atrofia de las ramificaciones dendríticas y reducción de la densidad de espinas (McEwen y Magariños, 2001). Las consecuencias adversas de la elevación prolongada de GC son particularmente dramáticas cuando coinciden con un daño neuronal, como sucede en isquemia, epilepsia, hipoglucemia, etc. (Goodman et al., 1996; Sapolsky y Pulsinelli, 1985; Sapolsky, 1985; Tombaugh y Sapolsky, 1992; Tombaugh et al., 1992).

La neurotoxicidad de los GC también ha sido demostrada en humanos. En las últimas dos décadas numerosos estudios con técnicas de neuroimagen, como la tomografía de emisión de positrones (PET) o la espectroscopia de resonancia magnética, han correlacionado la pérdida neuronal en el hipocampo por altos niveles de GC con la duración y grado de depresión en pacientes humanos. Esta relación también se ha observado en pacientes con Síndrome de estrés post-traumático (SEPT) (rev. en Sapolsky, 1996).

El aumento de los GC también aparece, aunque en menor medida, en otras regiones cerebrales aparte del hipocampo, como en el estriado, corteza y los núcleos basales; afectando la sensibilidad y respuesta neuronal frente a distintos estímulos nocivos en estas regiones (Abraham et al., 1997; Iyer et al., 1998).

Los mecanismos por los que los GC ejercen sus efectos nocivos sobre el SNC son muy variados; uno de los más conocidos es la inhibición de la utilización de glucosa por las células cerebrales. Los mecanismos propuestos son dependientes de receptor, y se basan en una translocación de los transportadores de glucosa GLUT desde la membrana celular a posiciones intracelulares (Horner et al., 1987), y en la inhibición de la transcripción de los transportadores de glucosa en cerebro (Garvey et al., 1989). La falta de glucosa provoca en las neuronas un estado de compromiso energético que aumenta su susceptibilidad frente a cualquier tipo de estímulo neurotóxico, como por ejemplo, el daño isquémico (Sapolsky y Pulsinelli, 1985).

Otro de los mecanismos de los efectos nocivos de los GC en el SNC que ha recibido mayor atención, es el aumento de la susceptibilidad al proceso de muerte

neuronal conocido como excitotoxicidad por altas concentraciones de aminoácidos excitadores (glutamato) que se explicará más adelante.

2.1.2. Catecolaminas

En el SNC, las catecolaminas activan ciertas regiones del sistema límbico como la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo e inhiben otras como la corteza frontal, donde residen los centros cognitivos. Al activar la amígdala (centro regulador de la expresión de las emociones y su relación con los estímulos (Aggleton et al., 1992)), ciertas catecolaminas, como la NA, actúan sobre los receptores β -adrenérgicos presentes y son capaces de potenciar la consolidación de la memoria, dando lugar al recuerdo de situaciones especialmente estresantes como en la rememoración del suceso estresante en pacientes con síndrome de estrés post-traumático (SEPT) (Charney et al., 1993).

A nivel de corteza prefrontal, la exposición a catecolaminas producidas por estrés dificulta su funcionamiento, de manera que afecta a la memoria operativa que controla la atención, el comportamiento y las respuestas adecuadas frente a cualquier situación (Goldman-Rakic, 1987).

Los sistemas noradrenérgicos juegan un papel importante en la respuesta al miedo y en el estado de alarma (incrementos del ritmo y presión cardíaca, comportamiento de alerta). De hecho, existen estudios en animales que sugieren la activación de los sistemas catecolaminérgicos en el estado de sobre-alerta que se puede observar también en individuos con SEPT (Abercrombie y Jacobs, 1987). El aumento en la concentración de dopamina que tiene lugar tras la acción de ciertos estímulos estresantes, se ha relacionado con la aparición de síntomas psicóticos en pacientes con SEPT (Hamner y Gold, 1998).

Por último, numerosos autores han propuesto a las catecolaminas como moléculas supresoras de la respuesta inmunitaria/inflamatoria constituida por citoquinas, a través de su unión con los receptores α y β -adrenérgicos presentes en células inmunes como macrófagos o células T (Maruta et al., 1997; Tomozawa et al., 1995). De hecho, se ha podido demostrar que la adrenalina liberada tras estrés reduce la liberación del Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) y de la interleuquina 6 (IL-6) (Liao et al., 1995; Van Gool et al., 1990).

2.1.3. Aminoácidos excitadores

Uno de los procesos iniciales que tiene lugar en la respuesta al estrés es el aumento de las concentraciones extracelulares de aminoácidos excitadores, principalmente de glutamato, en distintas regiones cerebrales (Moghaddam, 1993). Este aumento de aminoácidos excitadores a nivel extracelular se debe a una liberación inmediata y sostenida de glutamato y aspartato durante la fase de alarma. Concentraciones de glutamato elevadas y mantenidas por periodos de tiempo superiores a unos minutos son excitotóxicas, ya que causan disfunción y degeneración neuronal.

Los mecanismos intracelulares responsables de la muerte neuronal por excitotoxicidad son complejos y heterogéneos. Se sabe que un elemento clave en la toxicidad del glutamato es su acción sobre sus receptores ionotrópicos de tipo N-metil-aspartato (NMDA), cuya activación facilita la entrada masiva de cationes, mayoritariamente de calcio (Ca^{2+}) al citoplasma celular (Choi, 1985). Un exceso de iones calcio es capaz de activar gran cantidad de señales de segundos mensajeros que intervienen en el proceso de daño celular (Figura 3). Se ha observado que el Ca^{2+} por un lado, inhibe la producción de energía (ATP) y por otro, activa enzimas que intervienen en la degradación de proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (rev. en Sattler y Tymianski, 2000).

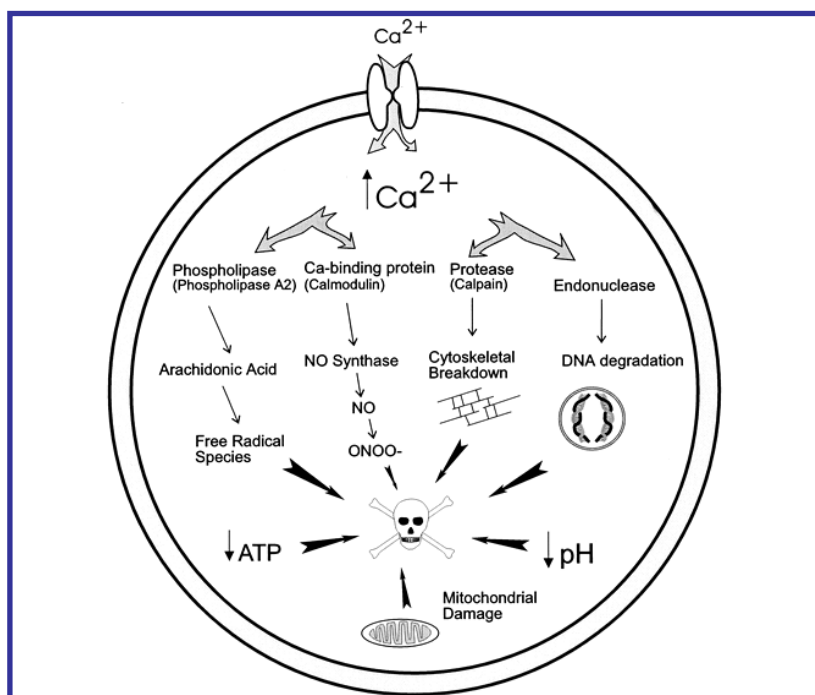


Figura 3. Esquema descriptivo de los mecanismos moleculares por los que el aumento de Ca^{2+} intracelular induce neurotoxicidad (Adaptado de Sattler y Tymianski, 2000)

Se ha podido demostrar que los GC, también liberados en la respuesta general a estrés aunque de manera más sostenida en el tiempo, exacerban el proceso de excitotoxicidad actuando a varios niveles:

- Aumentan la entrada de calcio al interior celular al alterar las subunidades de los canales de Ca^{2+} (Nair et al., 1998) e inhiben su recaptación a través de la Ca^{2+} /ATPasa (Bhargava et al., 2000) y del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ (McEwen y Sapolsky, 1995).

- La liberación de glutamato al espacio extracelular de la hendidura sináptica, es un mecanismo de "aclarado" finamente regulado para evitar la estimulación excesiva de los receptores NMDA y así evitar que el proceso de excitotoxicidad tenga lugar. Se ha podido demostrar mediante la realización de diferentes protocolos de estrés en rata que los GC son capaces de inhibir la recaptación sinaptosomal de glutamato (Leza et al., 1998) y que además el estrés es capaz de disminuir la expresión en membrana de los transportadores EAAT-2 y EAAT-3 (Madrigal et al., 2003a).

- Los GC producen una caída en los niveles de ATP en cerebro (Tombaugh y Sapolsky, 1992; De Cristóbal et al., 2001). Se ha demostrado que cuando se produce una disminución en los niveles de ATP, tiene lugar una reversión de los transportadores de glutamato, produciéndose el efecto contrario de liberación, aumentando así la susceptibilidad a excitotoxicidad. Esta reversión también ha sido propuesta en el estrés (Lawrence y Sapolsky, 1994; Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000b).

2.2. ESTRÉS Y NEUROINFLAMACIÓN

En un principio se pensó que el estrés produce un estado de inmunodepresión relacionada con un aumento de la probabilidad de sufrir una patología infecciosa bacteriana o viral, y que el eje HPA se activaría como mecanismo de freno frente a una activación excesiva del sistema inmune, donde los GC liberados son los agentes antiinflamatorios más importantes (Rhen y Cidlowski, 2005). En los últimos años, algunos autores se han cuestionado la universalidad de este papel antiinflamatorio, y se han descubierto situaciones en las que estos mediadores desencadenan un proceso proinflamatorio. Hoy se sabe que distintos tipos de estrés pueden producir un estado de inmunoestimulación (rev. en Raison et al., 2006).

Gran parte de los efectos estimuladores del estrés sobre la inmunidad se deben a la acción de las catecolaminas, aunque los GC también participan en esta activación. La cuestión de cómo los GC pueden ser a la vez anti y proinflamatorios es muy compleja como se ha visto en el apartado anterior. Parece ser que su papel depende de la concentración, lugar de acción (distinto en sistema nervioso central que en periferia) y duración del estímulo, entre otros factores.

La inflamación es un proceso estrechamente relacionado con el sistema inmune. Se trata de una compleja red de mecanismos coordinados que se regulan por la interacción de mediadores como citoquinas, prostaglandinas, quemoquinas, sustancia P, etc. Estos mediadores inducen una respuesta no específica caracterizada por fiebre, comportamiento de enfermedad (que se conoce como *sickness behaviour*) y activación del eje HPA (Allan y Rothwell, 2003). Se trata de un proceso altamente adaptativo que permite al organismo defenderse de infecciones y lesiones. Sin embargo, si la inflamación es excesiva en intensidad o duración, puede ser dañina y causar diversas enfermedades.

La neuroinflamación es el proceso inflamatorio que ocurre a nivel del SNC. Se ha demostrado que el SNC también responde frente a estímulos inflamatorios periféricos o locales. Al igual que en el resto del organismo, el proceso se caracteriza por el aumento de distintos mediadores, como citoquinas, prostaglandinas, etc. También en este caso, si la neuroinflamación es excesiva puede causar daño. (rev. en García-Bueno et al., 2008). De hecho, durante los últimos años se ha estudiado que la mayoría de las enfermedades que afectan al SNC, ya sean autoinmunes, degenerativas o psiquiátricas, cursan con neuroinflamación. La dificultad reside en determinar si esta neuroinflamación es causa o consecuencia de la enfermedad.

La relación entre inflamación y estrés es muy estrecha. Por un lado, la liberación de GC y catecolaminas durante el estrés, se asemeja a parte del proceso generado en el organismo tras la invasión de un patógeno, un trauma y/o daño tisular. Por otro lado, los componentes liberados durante la respuesta a estrés (citoquinas, enzimas oxidativas, factores de transcripción, etc.) la hacen análoga a cualquier respuesta inflamatoria.

Tras exposición a estrés por inmovilización, cuando los GC endógenos están elevados, se produce una liberación y acumulación de mediadores típicamente proinflamatorios, como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas proinflamatorias (PGE₂), citoquinas, activándose también el factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B) (Madrigal et al., 2003b). Estos mediadores conducen a un estado de neuroinflamación

que podría contribuir al daño cerebral observado en las neuropatologías asociadas con la exposición a estrés.

2.2.1. Citoquinas

Las citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 1 beta o la 6 (IL-1 β , IL-6) o el TNF α , son moléculas pleiotrópicas producidas por una gran variedad de tipos celulares tanto en la periferia como en el SNC. En general, estos mediadores están asociados a la defensa del organismo, de manera que aumentan con estímulos infecciosos o inflamatorios. Estas citoquinas llegan incluso a desencadenar cambios comportamentales o psicológicos característicos de estos procesos inflamatorios.

Un gran número de evidencias indican que los GC y las catecolaminas, principales mediadores del estrés, inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF α , la interleuquina 12 (IL-12) o el interferón gamma (IFN γ), mientras que estimulan la producción de citoquinas antiinflamatorias como interleuquina 10 ó 4 (IL-10 o IL-4) (Raison y Miller, 2003).

Sin embargo, numerosos estudios muestran cómo los distintos tipos de estrés (físico, psicológico o mixto) pueden producir, tanto en roedores como en primates e incluso humanos, un marcado incremento en los niveles plasmáticos de diversas citoquinas clásicamente proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 o el IFN γ (Ackerman et al., 1998; Dunn et al., 1999; Holden y Pakula, 1999; Maes et al., 1998; Minami et al., 1991; Nukina et al., 1998; Ruddle, 1992; Shintani et al., 1995; Yamasu et al., 1992).

– Interleuquina 1 beta (IL-1 β): Es una citoquina proinflamatoria que puede ser inducida por distintos estímulos incluyendo el lipopolisacárido bacteriano (LPS), la propia IL-1 β (autoinducción) (Dinarello et al., 1987), otras citoquinas y leucotrienos (rev. en Mackowiak et al., 1997), se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Es una citoquina “temprana” implicada en la producción de otras más “tardías”, como IL-2, IL-6 y TNF α , que contribuyen al proceso inflamatorio (Lucas et al., 2006). Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria, ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda.

La exposición a diversos agentes estresantes induce la síntesis de IL-1 β en el SNC, principalmente en hipotálamo; por su parte esta citoquina media la producción de GC y catecolaminas (Nguyen et al., 1998; O'Connor et al., 2003). Además, la IL-1 β está implicada en los déficits cognitivos y síntomas de depresión (*depressive like*

behaviour) inducidos por estrés (Maier y Watkins, 1998) y la administración de IL-1 β exógena induce *sickness behaviour* (rev. en Dantzer et al., 2008)).

Los principales productores de IL-1 β son los macrófagos (Lisi et al., 1987) aunque también se sintetiza por neutrófilos, linfocitos T y B, microglía, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y renales (Dinarello, 1994).

En resumen, la IL-1 β aumenta tras la exposición a múltiples estímulos estresantes en SNC, mayoritariamente en hipotálamo, y afecta a la respuesta comportamental y neuroendocrina, pudiendo tener implicaciones clínicas a largo plazo.

– Interleuquina 6 (IL-6): Es una citoquina pleiotrópica producida tanto por células inmunes como no inmunes. En general, el aumento de su producción está asociado con una desregulación de la homeostasis interna tras traumatismo, daño tisular, sepsis y otras situaciones inflamatorias.

En situaciones de exposición a estrés físico o psicológico, tanto en humanos como en roedores, se ha podido observar un aumento de la expresión de IL-6 en plasma (Zhou et al., 1993; Takaki et al., 1994). También se ha demostrado un aumento de IL-6 en cerebro inducido por una secreción previa de IL-1 β (Kronfol y Remick, 2000). La expresión de IL-6 en otros tejidos implicados en la respuesta a estrés no está confirmada.

Por otro lado, la IL-6 estimula el eje HPA a varios niveles (hipotálamo, pituitaria y glándulas adrenales), activando la secreción de GC (Busbridge y Grossman, 1991). La IL-6, junto con los GC, promueve el aumento de las proteínas de fase aguda (Wilckens y De Rijk, 1997).

Al contrario que otras citoquinas, como la IL-1 β , que promueven el *sickness behaviour*, la IL-6 actúa a nivel del SNC como neuromodulador inhibiendo comportamientos asociados al estrés, como la ansiedad (Butterweck et al., 2003). Esto indica que esta citoquina proinflamatoria tiene un papel complejo en el estrés, pues su expresión tiene consecuencias tanto beneficiosas como dañinas para las células del SNC.

– Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α): Es una citoquina que se libera rápidamente en su forma soluble en respuesta a distintas lesiones cerebrales, como la isquemia, traumas o infecciones (Wang y Shuaib, 2002).

En nuestro laboratorio se ha podido observar que sólo 30 minutos de estrés por inmovilización son suficientes para generar un aumento de la actividad del enzima

convertidora de $\text{TNF}\alpha$ (TACE) en corteza cerebral de rata y por lo tanto de la concentración de $\text{TNF}\alpha$ (Madrigal et al., 2002a). Posteriores investigaciones desvelaron la implicación del glutamato en esa liberación de $\text{TNF}\alpha$, de este modo, la administración de un bloqueante específico de los receptores NMDA previa a estrés redujo la actividad y expresión de TACE, así como los niveles de la citoquina (Madrigal et al., 2002a).

Una vez sintetizado, el $\text{TNF}\alpha$ media sus acciones pleiotrópicas a través de dos receptores funcionalmente distintos. El receptor tipo 1 (TNF-R1) y el tipo 2 (TNF-R2) difieren en sus dominios transmembrana y citoplasmáticos por lo que utilizan vías de señalización distintas (Bazzoni y Beutler, 1996).

La unión del $\text{TNF}\alpha$ al receptor TNF-R1 activa la vía que culmina con la activación y traslocación al núcleo del factor nuclear de transcripción κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$).

2.2.2. Factor Nuclear de transcripción *kappa* B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$)

Un factor clave regulador de la respuesta proinflamatoria a estrés es el Factor nuclear- κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$). En el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, se demostró que el estrés por inmovilización activa al $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en la corteza de ratas sometidas a estrés agudo (Madrigal et al., 2001a). Posteriormente, esta activación también ha sido observada en experimentos con monocitos procedentes de humanos sometidos a estrés psicológico (Bierhaus y Nawroth, 2003). Las investigaciones se centraron en las causas de esta activación y se implicó al glutamato y al $\text{TNF}\alpha$ liberados por estrés como los estímulos concretos responsables dentro del complejo mecanismo que constituye la respuesta general a estrés (Madrigal et al., 2002a). La activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es temprana en el estrés, de manera que es considerado uno de los principales reguladores de la respuesta inflamatoria observada en SNC.

El $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es un heterodímero (con dos subunidades p50 y p65, aunque puede haber otras subunidades y otros dímeros) que se expresa ubicuamente en SNC, y en situación basal se encuentra en citosol unido a proteínas inhibidoras de κB ($\text{I}\kappa\text{Bs}$), de manera que se mantiene inactivo. La activación puede darse en diferentes circunstancias, infecciones bacterianas o virales, exposición a radicales libres, a citoquinas, etc y consiste en la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}$ en citosol por las quinasas de $\text{I}\kappa\text{B}$

(IKK). El I κ B se degrada y el NF- κ B queda libre y se trasloca al núcleo donde se une a regiones específicas de DNA y activa la transcripción de ciertos genes. De hecho, el NF- κ B está relacionado con el control de la transcripción de más de 150 genes y responde a más de 150 estímulos (Pahl, 1999). Algunos de los genes diana codifican para proteínas que en su actividad producen la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos e inflamatorios, como la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Xie et al., 1994) o la isoforma 2 de la ciclooxigenasa (COX-2) (Appleby et al., 1994; Baldwin, 1996).

2.2.3. Enzimas dependientes de NF- κ B

– ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE: La familia de las Óxido Nítrico Sintetas (NOS) está formada por tres isoformas. La NOS-1 y la NOS-3 son isoformas constitutivas, mientras que la NOS-2 o iNOS es la isoforma inducible y se produce en células inmunitarias y en neuronas tras un estímulo, como LPS, citoquinas y patógenos.

La iNOS está implicada en fenómenos de citotoxicidad debido a las elevadas concentraciones de NO que libera su actividad (Moncada et al., 1991). El NO es un gas, radical libre, extremadamente reactivo, capaz de reaccionar con otras especies oxidativas como el anión superóxido (O_2^-), y formar peroxinitrito ($ONOO^-$), uno de los principales agentes de la generación de estrés oxidativo, pues altera membranas lipídicas por peroxidación lipídica, proteínas y DNA (rev. en Szabo, 2003).

El estrés agudo (6 horas) por inmovilización, induce la expresión y actividad de iNOS en cerebro (corteza, hipocampo) (Madrigal et al., 2001a) y estudios con exposiciones más prolongadas a estrés (6 horas al día durante 3 semanas) producen una inducción aún mayor (Olivenza et al., 2000). En el estrés, a parte del ya comentado efecto de la peroxidación lipídica, el NO ha sido implicado en la disrupción de la barrera hematoencefálica y en la disminución de la función mitocondrial (Madrigal et al., 2001b; Madrigal et al., 2002b).

La expresión y actividad de iNOS en estrés no sólo depende del factor NF- κ B, sino de otros factores anteriores dentro de la cadena de eventos que tiene lugar, como la liberación del aminoácido excitador glutamato y de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β o TNF α (Madrigal et al., 2002a; Pacher et al., 2007).

– CICLOOXIGENASA 2 (COX-2): La isoforma inducible de las ciclooxygenasas es la COX-2, y es responsable de la síntesis de endoperóxidos que se transforman en los prostanoïdes o prostaglandinas (PG), por la acción de distintas sintasas específicas en cada tejido. Mediadores inflamatorios como citoquinas o LPS, inducen rápidamente la expresión de COX-2, que apenas se observa en tejidos sanos, salvo en riñón, estómago y algunas regiones cerebrales (corteza prefrontal, hipocampo, amígdala), donde se expresa de forma constitutiva (Hoffman et al., 2000).

La actividad de COX-2 puede ser neurotóxica, pues es capaz de formar niveles de prostaglandinas PGE₂ muy superiores a los niveles basales, con un claro componente proinflamatorio asociado, ya que PGE₂ puede inducir una liberación masiva de glutamato y generar muerte celular por apoptosis (Takadera et al., 2002), y porque su actividad genera especies reactivas de oxígeno que contribuyen al daño oxidativo/nitrosativo (Egan et al., 1976; Phillis et al., 2006) (Figura 4).

En cuanto a la función de COX-2 en la respuesta a estrés, los primeros estudios demostraron un incremento del RNA mensajero de COX-2 en el cerebro de ratas estresadas físicamente (Yamagata et al., 1993), más adelante el grupo de investigación en el que se realizó la presente Tesis, observó un aumento de la expresión y de la actividad de la enzima COX-2 en la corteza cerebral de ratas que han sido expuestas a 4 y 6 horas de estrés por inmovilización (Madrigal et al., 2003c). Los resultados revelaron una relación directa entre la actividad de COX-2 y los procesos de peroxidación lipídica y depleción de los principales antioxidantes celulares (glutación), que pueden aumentar la susceptibilidad celular al daño observado tras la exposición a estrés. Como en el caso de iNOS, la expresión y actividad de COX-2 está regulada por glutamato y NF-κB (Madrigal et al., 2003c). La administración de un inhibidor selectivo de COX-2 atenúa tanto las alteraciones bioquímicas como las comportamentales, principalmente las relacionadas con ansiedad, que se producen tras estrés por inmovilización (Dhir et al., 2006).

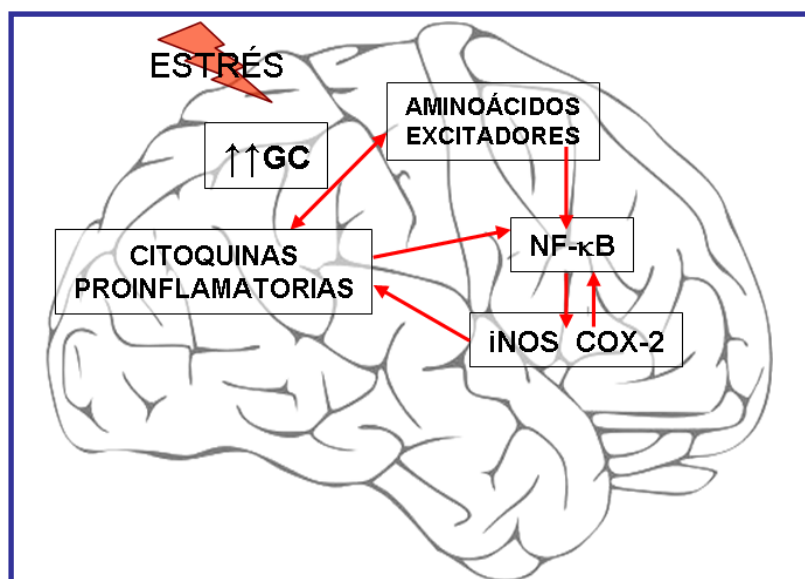


Figura 4. Esquema de la cadena de acontecimientos que llevaría a la acumulación de mediadores oxido/nitrosativos en el cerebro tras la exposición a estrés por inmovilización. Aminoácidos excitatorios como glutamato; NF- κ B: factor nuclear κ B; iNOS sintasa de óxido nítrico inducible; COX-2: Ciclooxygenasa-2 o inducible.

2.2.4. Mediadores antiinflamatorios

Sin embargo, no todos los mecanismos que se desencadenan en el cerebro tras la exposición a estrés son proinflamatorios. Uno de los mecanismos que está recibiendo especial atención en los últimos años, es el de ciertas prostaglandinas con función antiinflamatoria derivadas de la activación de COX, en especial la 15-deoxi-prostaglandina J_2 (15d-PG J_2), ligando endógeno de los receptores nucleares activados por los proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ). Estos receptores se han implicado directamente en la regulación de la respuesta inflamatoria en múltiples modelos animales de neuropatologías (Feinstein, 2003). En concreto, en un modelo de inflamación en rata, demostraron que la COX-2 es proinflamatoria (vía PGE $_2$) durante el desarrollo de la inflamación, pero anti-inflamatoria (vía PGD $_2$ y 15d-PG J_2) durante la resolución de la misma (Gilroy et al., 1999). Así, la propia COX-2 es fuente de 15d-PG J_2 , PG con acción antiinflamatoria en el SNC (Scher y Pillinger, 2005).

- 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J_2 (15d-PG J_2)

Las PGs son mediadores lipídicos sintetizados a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, principalmente a partir del ácido araquidónico (AA), generado a partir de los fosfolípidos de membrana y derivado de fuentes dietéticas.

Las PGs no se almacenan en los tejidos (excepto en el fluido seminal), sino que se sintetizan en respuesta a diversos estímulos y producen un amplio espectro de efectos biológicos (Narumiya et al., 1993). Las PGs contribuyen a la inflamación, tono del músculo liso, hemostasis, trombosis, parto y secreciones gastrointestinales, entre otros (Tsuboi et al., 2002).

La 15d-PGJ₂ es un metabolito no enzimático de la PGD₂. No se ha identificado todavía un receptor transmembrana específico para la 15d-PGJ₂, pero parece que esta PG ejerce sus efectos principalmente a través de la interacción con sus dianas intracelulares, que incluyen receptores nucleares y proteínas cuya función se ve modificada por la unión covalente con la 15d-PGJ₂. El mecanismo de entrada en las células es probable que sea mediante un sistema de transporte activo (Narumiya et al., 1986).

La síntesis de las PG se representa en la Figura 5.

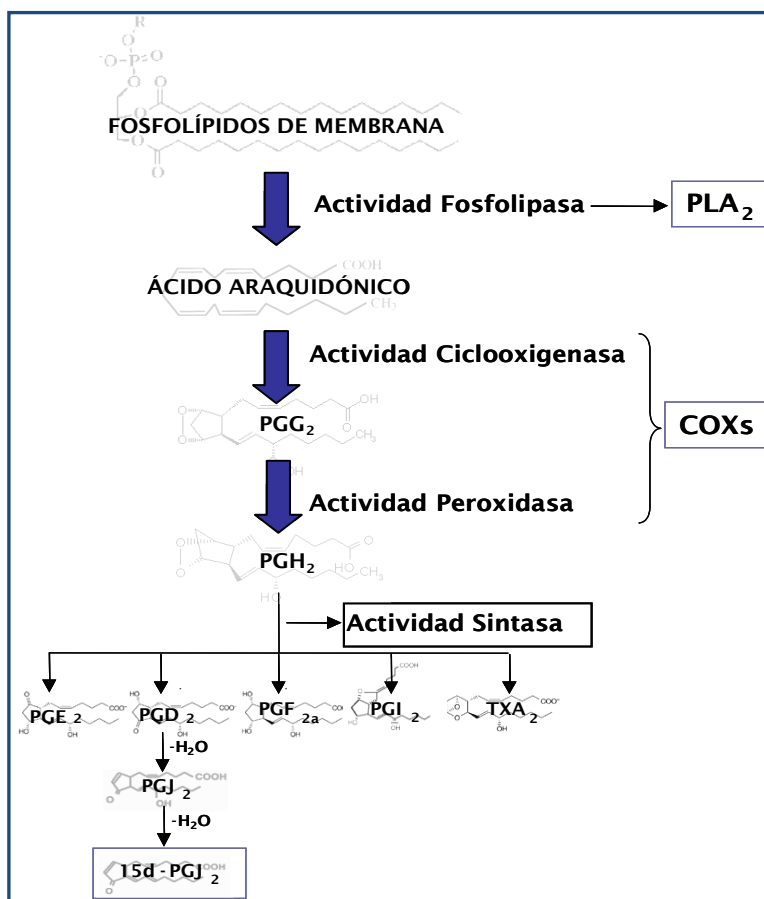


Figura 5. Esquema de la síntesis de prostaglandinas. Acción de las enzimas fosfolipasa A₂ (PLA₂), ciclooxygenasas (COX) y sintasas para dar lugar a PGs, prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TX)

La 15d-PGJ₂ posee distintas acciones antiinflamatorias. Puede actuar de manera independiente al receptor activado por proliferadores de peroxisomas-γ

(PPAR γ), puesto que posee una estructura muy reactiva (anillo ciclopentenoico) que le permite interactuar y modificar la función de otras moléculas, por ejemplo se une de forma covalente a las IKK encargadas de fosforilar I κ B, impidiéndoles realizar su función, evitando así la activación y translocación de NF- κ B al núcleo (Rossi et al., 2000a). Se inhibe así la expresión de ciertos genes proinflamatorios dependientes de NF- κ B. La 15d-PGJ₂ también es capaz de inhibir la unión de NF- κ B al DNA, por alquilación de un residuo de cisteína localizado en el dominio de unión a DNA del NF κ B (Straus et al., 2000). Además, la 15d-PGJ₂ a través del receptor PPAR γ inhibe no sólo NF- κ B, sino que también inhibe otros factores nucleares como la proteína activadora 1 (AP-1) y la *Signal Transducer and Activator of Transcription* 1 (STAT-1) activados por LPS (Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998) y tiene efectos antiproliferativos de células T (rev. en Zhang y Young, 2002).

- Receptores activados por peroxisomas (PPARs)

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPARs, constituyen una subfamilia dentro de la superfamilia de receptores nucleares para hormonas (tiroidea, glucocorticoides, mineralocorticoides, ácido retinoico, esteroides sexuales, vitamina D, etc.) (rev. en Houseknecht et al., 2002) y actúan como factores de transcripción dependientes de ligando (sea sintético o endógeno), uniéndose al DNA en regiones específicas (elementos de respuesta a PPAR o PPREs) y regulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, glucídico y los procesos de diferenciación celular e inflamatorio, fundamentalmente.

Estos receptores se han implicado directamente en la regulación de la respuesta inflamatoria en múltiples modelos animales de neuropatologías con componente inflamatorio.

La isoforma de PPAR más estudiada en el ámbito de la neuroinflamación es PPAR γ , y aunque posee un gran número de ligandos, 15d-PGJ₂ es el ligando endógeno mejor descrito y más utilizado. PPAR γ y sus ligandos parecen ser reguladores fundamentales de la fisiología del cerebro, y potenciales dianas para el tratamiento de patologías del SNC. Aún se desconocen los mecanismos moleculares precisos por los que la activación de PPAR confiere neuroprotección, pero las causas conocidas son múltiples: inhibición de la sobreactivación glial, bloqueo de la proliferación de linfocitos T, de la actividad de metaloproteasas de matriz, y de moléculas de adhesión, activación de la apoptosis de linfocitos T y de macrófagos, y

posible control del metabolismo energético de neuronas y astrocitos en enfermedades como Alzheimer o esclerosis múltiple (Houseknecht et al., 2002; Feinstein, 2003).

Experimentos realizados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, demostraron que el estrés agudo por inmovilización aumenta la producción de 15d-PGJ₂ y la expresión y actividad de PPAR_γ en la corteza cerebral de rata. Esta activación de la vía antiinflamatoria, está regulada por los principales mediadores del estrés (GC, catecolaminas y glutamato) (García-Bueno et al., 2005a). También se pudo observar que la administración de ligandos endógenos o exógenos de PPAR_γ, es capaz de prevenir la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos en el SNC de ratas tras la exposición a estrés agudo y crónico (García-Bueno et al., 2005b).

En resumen, los distintos mediadores del estrés pueden activar mecanismos pro y antiinflamatorios dependiendo de la naturaleza, intensidad y duración del estímulo. Estas vías están representadas en la Figura 6 (García-Bueno y Leza, 2008).

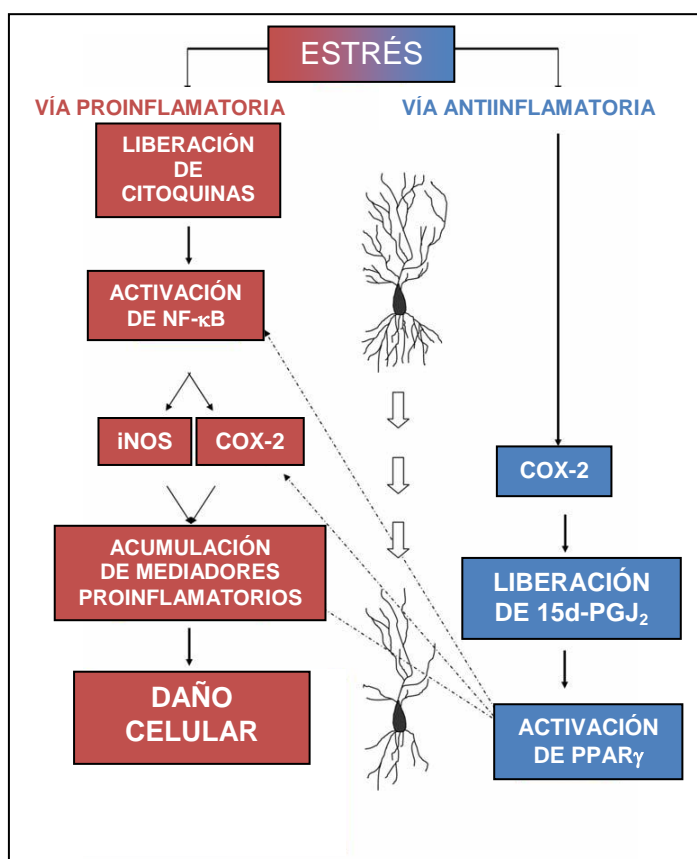


Figura 6. Esquema-resumen de las vías proinflamatoria y antiinflamatoria activadas por el estrés en el cerebro (adaptado de García-Bueno y Leza, 2008).

Línea continua = estimulación; línea punteada = inhibición

3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ESTRÉS

3.2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ESTRÉS

El estrés crónico, intenso e incontrolable ha sido asociado con el inicio, desarrollo y resolución de múltiples enfermedades que afectan a la casi totalidad de los sistemas orgánicos (rev. en Baum y Posluszny, 1999).

El estrés se ha relacionado con un aumento del riesgo de sufrir patologías del sistema cardiovascular, como angina de pecho o infarto de miocardio, mediante la activación del sistema nervioso simpático y la hipertensión asociada (Lindvall et al., 1991; Esch et al., 2002a). Por otro lado, en individuos con una respuesta a estrés más intensa, se observa un fuerte aumento de la presión sanguínea, lo que incrementa las probabilidades de sufrir un ictus isquémico o una isquemia cardiaca (Singh et al., 1999; Larson et al., 2001; Soufer et al., 2009).

La relación entre el estrés y el sistema inmune fue evidente desde los primeros estudios de Selye en 1936, en los que observó una hipertrofia del timo tras someter a los animales a estímulos estresantes; desde entonces diversos estudios han comprobado que los agentes estresantes pueden tener un fuerte impacto sobre las funciones inmunes, en humanos y en otras especies animales (Bartolomucci et al., 2005).

En situaciones de estrés crónico se inhibe el sistema inmune, así los procesos de inflamación, infección, enfermedades autoinmunes y quizá, el origen y desarrollo de ciertos tumores, están estrechamente relacionados con el estrés (Esch et al., 2002b). También se ven afectados otros procesos relacionados con el sistema inmune como las reacciones alérgicas, las enfermedades de la piel (acné, psoriasis, eczema), así como las caries y la periodontitis gingival que aumentan con el estrés (Baum y Posluszny, 1999).

Otras patologías asociadas al estrés son las del sistema reproductor. Se ha observado que el estrés y la ansiedad están estrechamente relacionados con la disfunción eréctil en hombres (Araujo et al., 1998). En mujeres se ha observado que puede disminuir la libido, empeorar el síndrome premenstrual y la fertilidad (Berga, 1996; Fenster et al., 1999; Allsworth et al., 2007). Por otro lado, mujeres embarazadas expuestas a estrés pueden sufrir complicaciones durante el embarazo y puede tener

una gran repercusión en el desarrollo de diversas patologías por parte del niño (Tegethoff et al., 2011).

El sistema digestivo se ve muy afectado por los estímulos estresantes. Así, existen varias patologías asociadas a la exposición a estrés, como el síndrome del colon irritable, las úlceras peptídicas o la enfermedad inflamatoria intestinal, debido a que el estrés provoca un aumento de la inflamación en el tracto gastrointestinal (Ellard et al., 1990; Bennett et al., 1998; Levenstein et al., 2000). La relación entre estrés y digestivo la desarrollaremos más adelante ya que es importante para el planteamiento de la hipótesis del presente estudio.

Por otro lado, el estrés altera la ingesta, tanto aumentándola, como disminuyéndola. De hecho, el estrés está asociado a la anorexia y a la bulimia nerviosa (Rojo et al., 2006; Tagay et al., 2010).

El estrés afecta al SNC, donde una exposición aguda desencadena una repuesta inflamatoria, de manera que también está asociado con múltiples patologías del SNC con un componente inflamatorio en su fisiopatología (Esch et al., 2002c).

3.2. PATOLOGÍAS DEL SNC ASOCIADAS AL ESTRÉS

En lo que respecta al sistema nervioso, el estrés está íntimamente relacionado con numerosas enfermedades neurodegenerativas o de base inflamatoria (enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, etc), y patologías psiquiátricas como la ansiedad, la esquizofrenia o la depresión.

3.2.1. Enfermedades neurodegenerativas

El proceso de neurodegeneración está muy relacionado con el estrés, se ha podido observar que existe una relación entre la intensidad en la respuesta al estrés, el índice de neurodegeneración edad-dependiente y la reducción de la esperanza de vida (Gilad y Gilad, 1995). Aunque el estrés afecta a todas las enfermedades neurodegenerativas, analizaremos sólo la enfermedad de Alzheimer y la Esclerosis Múltiple, por exponer en detalle dos de las enfermedades sobre las que más se ha estudiado, y tener dos representantes de patologías cuya incidencia está aumentando considerablemente en los últimos años: las demencias y las enfermedades autoinmunes.

- Enfermedad de Alzheimer

Los efectos deletéreos del estrés se concentran en el hipocampo, y por lo tanto, en las funciones que éste lleva a cabo, como el control del funcionamiento del hipotálamo, y por lo tanto, de la liberación del CRH y de los GC, o el aprendizaje, la consolidación de la memoria y su regulación sobre la amígdala (centro controlador del de la emociones) (Mizoguchi et al., 1992).

Estos efectos sobre el hipocampo pueden exacerbar la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer (EA) que cursa con deterioro cognitivo. Por otro lado, la respuesta general a estrés induce un claro estado neuroinflamatorio, componente que también comparte con la EA (microgliosis con secreción de IL-6 alrededor de las placas seniles, predominantemente en la zona CA1 del hipocampo), y sobre el que podría influir contribuyendo a los síntomas de la enfermedad (Esch et al., 2002c).

En la EA se produce una hipercortisolemia. En general, el envejecimiento provoca un aumento de la niveles de cortisol en plasma, que en los casos de demencia son incluso mayores (Dodt et al., 1991). Varios grupos han demostrado un aumento de la actividad del eje HPA en EA mediante la determinación del cortisol en plasma. No obstante su relación con el deterioro cognitivo no está tan claro: mientras unos afirmaban que se relaciona de forma lineal con el deterioro cognitivo (Weiner et al., 1997) otros no encontraron ninguna relación (Peskind et al., 2001).

El origen de la hipercortisolemia que tiene lugar en EA no se ha explicado totalmente, puede ser un mecanismo compensatorio a la neuroinflamación que tiene lugar en esta enfermedad o puede ser resultado de la atrofia del hipocampo que afecta al *feedback* del eje HPA (Angelucci, 2000).

Teniendo en cuenta que la EA está mediada por procesos inflamatorios y que el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) ha resultado beneficioso, podría esperarse que el tratamiento con corticosteroides exógenos retrasase el progreso de la enfermedad. Sin embargo, un estudio con pacientes a los que se administraba prednisona demostró que no conducía a una mejora de los síntomas cognitivos (Aisen et al., 2000). La explicación podría ser que los corticosteroides exógenos actúan a nivel de la hipófisis (donde la integridad de la BHE está comprometida) activando el *feedback* negativo del eje HPA. Los efectos que se derivan de este hecho son la disminución de la liberación de cortisol endógeno, así las células del cerebro se encuentran con niveles más bajos de corticosteroides.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, recientemente demostró que la exposición a estrés por inmovilización durante tres semanas acelera la deposición de placas de β -amiloide en cortex e hipocampo en un modelo de EA con ratones transgénicos. Entre los mecanismos implicados se han identificado una mayor astrogliosis y liberación de mediadores neuroinflamatorios y oxidativos/nitrosativos como el NO (Pérez-Nievas et al., 2011).

- Esclerosis múltiple

Los pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) presentan al inicio de la enfermedad una hipoactividad del eje HPA, mientras que en estadios más avanzados, los niveles plasmáticos de cortisol están aumentados (Michelson et al., 1994), y el tamaño de las glándulas adrenales es mayor (Reder et al., 1994). La hiperactividad del eje HPA en la EM tardía podría ser debida a un fallo del *feedback*, por la degeneración de las áreas del cerebro encargadas del mismo. Esto se ve reflejado en la correlación positiva que existe entre la actividad del eje HPA y los deterioros cognitivos en EM (Heesen et al., 2002).

Se ha relacionado la exposición a estrés crónico de tipo psicosocial con el recrudecimiento de los síntomas de la EM y de otras enfermedades autoinmunes del SNC (Strengé, 2001). Sin embargo, en un modelo animal de encefalitis alérgica experimental (EAE) llevado a cabo por el grupo de investigación donde se realizó esta Tesis, se vio que las consecuencias de la exposición a estrés por inmovilización inmediatamente tras la inducción de EAE, presentan un perfil bifásico. En un primer momento (12 días de exposición), acelera la aparición de los síntomas, posteriormente (a las 3 semanas de exposición), la enfermedad presenta una forma menos grave en el grupo de animales sometidos a estrés (Pérez-Nievas et al., 2010). Entre los mecanismos implicados en esta respuesta bifásica se han identificado una mayor disrupción de la BHE (mayor expresión de la metaloproteasa de matriz MMP-9) y un mayor estado neuroinflamatorio (mayor expresión de COX-2 y niveles de PGE₂). Por otra parte, a las tres semanas de la inducción de la EAE, el estrés por inmovilización diario pone en marcha mecanismos compensatorios que resultan beneficiosos para su resolución, presentando niveles menores de neuroinflamación y menor pérdida de mielina. Entre estos mecanismos se ha identificado una menor expresión de iNOS, COX-2, y menor peroxidación lipídica en el grupo sometido a estrés desde la inducción de EAE, menor disrupción de la BHE (menor expresión de MMP-9) y un balance de PG antiinflamatorias/proinflamatorias a favor de las primeras, en el grupo sometido a

estrés desde la inducción de EAE con respecto al grupo EAE (Pérez-Nievas et al., 2010).

3.2.2. Enfermedades psiquiátricas

Un número elevado de enfermedades psiquiátricas se ven afectadas por el estrés, como se ha comentado anteriormente, ciertas citoquinas son incluso capaces de desencadenar por sí solas comportamientos depresivos. A continuación se describe con más detalle, la patología psiquiátrica que está directamente desencadenada por exposición a un estímulo estresante (Síndrome de estrés post-traumático) y la depresión, ambas estrechamente relacionadas con los objetivos de esta Tesis doctoral.

- Síndrome de estrés post-traumático (SEPT)

El SEPT o PTSD (de las siglas en inglés de *Post-Traumatic Stress Disorder*) es la enfermedad más relacionada con la exposición a estímulos estresantes. De hecho, las personas diagnosticadas con SEPT son individuos que han estado expuestos a un fenómeno estresante extremo (que en este caso se denomina “trauma”), ante el que respondieron con miedo, indefensión y horror. Gran parte de la investigación indica que un trauma es una condición necesaria aunque no suficiente para que se desarrolle un SEPT. Se ha observado que cuando los sucesos traumáticos ponen en peligro la vida del individuo o implican violencia, casi una cuarta parte de los individuos desarrollará SEPT, mientras que si se trata de sucesos menos graves, la proporción es menor (rev. en Paris, 2000). Estos datos indican que las diferencias individuales juegan un papel crucial a la hora de desarrollar esta patología.

Las personas con SEPT presentan tres tipos fundamentales de síntomas: rememoración subconsciente del trauma (pesadillas, “flashbacks”, imágenes persistentes), bloqueo de los recuerdos asociados al evento y estado de sobrealerta que suele durar al menos un mes desde el trauma, y que consiste en una activación fisiológica intensa y constante de respuesta a estrés, que se traduce con insomnio, irritabilidad, desconcentración, hipervigilancia y agresividad (rev. en Yehuda, 2002b).

Se ha descrito en pacientes con SEPT una disminución del volumen hipocampal, hecho consistente con el daño de los GC sobre la neuronas hipocampales

y que se relaciona con los déficits de memoria que presentan (rev. en Buckley et al., 2000). Estudios recientes han puesto en evidencia la posibilidad de que la disminución hipocampal fuese previa al SEPT, y constituyese un factor de predisposición a sufrir esta enfermedad (Kremen et al., 2012). Por otro lado, frente a estímulos “de miedo”, se observan una sobreactivación de la amígdala (Rauch et al., 2000) y una reactividad menor de las áreas anterior cingulada y orbitofrontal, todas relacionadas con las respuestas al miedo (Shin et al., 1999). El eje HPA está alterado en estas personas que presentan niveles bajos de cortisol, incluso años después del trauma (Mason et al., 1986; Yehuda et al., 1995), en las que paradójicamente los niveles de CRH están aumentados (Baker et al., 1999), y en las que se ha visto que la sensibilidad del *feedback* negativo del eje HPA es mayor de lo habitual (rev. en Yehuda, 2002a). Por otro lado, la noradrenalina está aumentada (Yehuda et al., 1998) lo que puede explicar varios de los síntomas somáticos observados.

- Depresión Mayor

La depresión (del latín *depressus*, que significa «opresión» o «abatimiento») es un desorden psiquiátrico grave que presenta una fisiopatología compleja, que aún no se conoce en su totalidad. La Organización Mundial de la Salud la describe como un trastorno mental cuya sintomatología incluye estados de abatimiento e infelicidad, pérdida de interés y de capacidad para sentir placer, sentimientos de culpa, baja autoestima, alteraciones del sueño y el apetito, falta de energía y problemas de concentración. Estos problemas pueden ser crónicos o recurrentes, dificultando la capacidad del individuo para llevar una vida “normal”.

El estrés puede ser la causa principal o un factor etiológico muy importante en los diversos tipos de depresión (Vaidya, 2000), incluida la depresión mayor (Meyer et al., 2001). De hecho, existen datos que sugieren que más de dos tercios de los pacientes con depresión han experimentado un estrés importante antes de la aparición de sus síntomas depresivos (Kendler et al., 1999; Mitchell et al., 2003).

Estrés y depresión están íntimamente relacionados a nivel fisiopatológico. En los años sesenta se demostró que los pacientes diagnosticados de depresión mayor presentan hipersecreción de cortisol (Gibbons y McHugh, 1962). Desde entonces diversos estudios han demostrado que las hormonas del eje HPA se encuentran alteradas en los pacientes que presentan esta patología (Carroll et al., 1976; Gold et al., 1986; Plotsky et al., 1998).

Algunos estudios demuestran que la hipercortisolemia hallada en pacientes con depresión mayor puede deberse a una hipersecreción de CRH (Nemeroff et al., 1984) y ACTH (Kalin et al., 1982; Pfohl et al., 1985). No obstante, la explicación para esta hipercortisolemia es controvertida, ya que se ha observado en algunos estudios que la concentración de ACTH en pacientes de depresión es variable. Sin embargo, el aumento de CRH es lo que parece crucial y está presente en todos los casos de depresión (Owens et al., 1991). El CRH es el primer elemento del eje HPA, y se considera el sustrato biológico de la relación entre estrés psicosocial y depresión (Owens et al., 1991). La regulación del eje HPA por los GC no funcionaría por una alteración de los receptores GR (Pariante y Miller, 2001). A diferencia de lo que ocurre en pacientes con SEPT donde el *feedback* negativo se potencia, en los pacientes con depresión esta regulación disminuye por una especie de “desensibilización” de los receptores (Modell et al., 1997).

La mayoría de modelos animales de depresión están basados en la exposición a estrés, como el modelo *Chronic mild stress*, utilizado en esta Tesis doctoral y que se explica más adelante (Willner et al., 1987). Se ha visto incluso, que animales a los que se administra corticosterona exógena desarrollan síntomas depresivos (Gourley y Taylor, 2009; Sterner y Kalynchuk, 2010).

Por otra parte, el estrés es uno de los mecanismos relacionados con la ansiedad, debido a la sobreactivación simpática que se produce tras un estrés crónico (Rachal et al., 2001). De hecho, en la clasificación de enfermedades mentales DSM-IV, en el apartado de Trastornos de ansiedad encontramos el trastorno por estrés agudo (F43.0), y el trastorno por estrés postraumático (F43.1) (*American Psychiatric Association*, 1994).

La serotonina (5-HT) es el neurotransmisor clásicamente implicado en la fisiopatología de la depresión. En un principio se consideró la depresión como un “desajuste” neuroquímico, dando lugar a la Teoría Monoaminérgica de la depresión. Fundamentalmente, está disminuida la transmisión de 5-HT, pero también las catecolaminas, principalmente la NA. Evidencias farmacológicas apoyan esta teoría, puesto que los tratamientos antidepresivos con mejores resultados compensan estos sistemas de neurotransmisores.

Parece existir una relación entre el eje HPA y el sistema serotoninérgico. Anatómicamente se observan conexiones entre las fibras serotoninérgicas y estructuras cerebrales que participan en el control de la respuesta al estrés como el núcleo paraventricular del hipotálamo o el hipocampo. El sistema serotoninérgico ha

sido implicado directamente en los efectos del estrés en el hipocampo. El estrés aumenta los niveles de 5-HT en esta estructura (Joseph y Kennett, 1983), y la administración exógena de 5-HT en el área CA1 inhibe el proceso de potenciación a largo plazo implicado en la formación de la memoria (Corradetti et al., 1992; Staubli y Xu, 1995), lo que parece indicar una acción supresora de la plasticidad sináptica.

La 5-HT y los corticoides interaccionan también a nivel de sus receptores. La administración de 5-HT regula al alza la expresión de los receptores GR, y la destrucción farmacológica de las proyecciones serotoninérgicas reduce los niveles de RNA mensajero de los receptores GR y MR en hipocampo (Seckl et al., 1990). La relación inversa también se ha descrito; así, ciertos protocolos de estrés crónico producen una regulación a la baja del receptor de 5-HT más abundante en el hipocampo, el 5-HT_{1A} (López et al., 1997).

Por último, la interacción entre serotonina y corticoides se pone en evidencia con el tratamiento de la depresión con antidepresivos tricíclicos, que disminuye la actividad del eje HPA y los niveles de cortisol en humanos (López et al., 1997).

Sin embargo, desde hace años se plantea que no sólo la serotonina es importante en la fisiopatología de la depresión. Cada vez más datos sugieren que una respuesta inmune e inflamatoria podría jugar un papel crucial en esta enfermedad, por lo que en los últimos años se ha desarrollado la Teoría Inflamatoria y Neurodegenerativa de la Depresión (I&ND) (Maes et al., 2009).

En el caso de la Teoría I&ND, también se encuentra una clara relación entre el estrés y la depresión. Como hemos visto, la activación del eje HPA puede inducir una respuesta de fase aguda muy similar, en la naturaleza de sus componentes, a la respuesta inflamatoria generada en un organismo en respuesta a infección o traumatismo agudo: activación glial, síntesis y liberación de citoquinas, radicales libres, prostaglandinas y factores nucleares, sobre todo en el SNC (rev. en García-Bueno et al., 2008), en la depresión existe una situación inflamatoria similar en la que las citoquinas juegan un papel importante (Miller et al., 2009).

Dos meta-análisis de distintos trabajos pusieron en evidencia que tanto la depresión mayor, como la exposición a estrés están estrechamente asociados a todos los parámetros inmunes medidos (Herbert y Cohen, 1993a,b). La depresión mayor se ha relacionado durante años con estados de inmunosupresión, pero actualmente se ha visto que este tipo de desórdenes se caracterizan por una activación del sistema inmune y, en especial, por una hiperactividad de las respuestas inflamatorias del sistema inmune innato (Maes, 1999; Raison et al., 2006). De hecho, los pacientes con

depresión mayor, que no presentan síntomas de ninguna otra enfermedad, tienen activadas ciertas vías proinflamatorias. Se ha observado un aumento en plasma y en el SNC (en particular se ha medido en el líquido cefalorraquídeo) de los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-6 (Levine et al., 1999), IL-1 β (Owen et al., 2001) o TNF α (Mikova et al., 2001). Además, se han asociado síntomas depresivos (fatiga, disfunciones cognitivas), incluso depresión, con marcadores inflamatorios en individuos que padecen otras enfermedades que cursan con inflamación, como patologías cardiovasculares (Lesperance et al., 2004; Miller et al., 2005) o cáncer (Bower et al., 2002; Meyers et al., 2005). Todas estas citoquinas son capaces de activar el eje HPA y están presentes en la neuroinflamación observada en la respuesta a estrés.

4. RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR-4)

Uno de los elementos de señalización celular en la respuesta inmune, son los receptores de inmunidad innata denominados *Toll-like Receptors* (TLRs). A continuación, se explican detalladamente las características del receptor Toll-like 4 (TLR-4), objeto de estudio de esta Tesis doctoral.

4.1. GENERALIDADES

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo frente a los patógenos. Está altamente conservada desde un punto de vista filogenético. Desde la mosca hasta los mamíferos, ciertos receptores son los responsables del reconocimiento temprano de estos patógenos.

En el año 1988 se descubrió la proteína “Toll” y su papel en el desarrollo del embrión de *Drosophila melanogaster*. Su nombre, “Toll”, deriva de su significado en alemán “raro”, pues las moscas que carecían de esta proteína tenían un desarrollo anormal (Hashimoto et al., 1988).

La función de estos receptores en el sistema inmune se descubrió en 1996, cuando se observó que jugaba un papel importante en la respuesta inmune de las *Drosophilas* frente a hongos (Lemaitre et al., 1996). Un año más tarde se clonó su

homólogo en humanos, y se le denominó “HumanToll-like” o h-toll (Medzhitov et al., 1997).

Actualmente, la familia de los TLRs forman parte de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), y consta de hasta 13 miembros descritos en mamíferos, 10 en humanos (TLR1-TLR10), y 12 en ratones, que carecen del TLR10 humano (Beutler et al., 2005).

Los TLRs de mamíferos son receptores del sistema inmune innato. Su función es identificar de manera temprana la presencia de patógenos en el organismo, al reconocer unas estructuras muy conservadas que se localizan en los microorganismos patógenos, pero no en los vertebrados. Estas estructuras se llaman Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*) (rev. en Takeda et al., 2003).

Los PAMPs no son factores de virulencia, sino estructuras esenciales en las funciones biológicas de los microorganismos. Esto supone que juegan un papel fundamental en la supervivencia de esos organismos, por lo que no se pueden modificar ni prescindir de ellos. Por eso apenas sufren mutaciones importantes y se conservan en la evolución.

En los últimos años, se ha visto que los TLRs no sólo son capaces de reconocer PAMPs, sino que son también los receptores de multitud de ligandos endógenos que en general son liberados en momentos de peligro o de daño tisular y se denominan Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs del inglés *danger-associated molecular pattern molecules*) (Seong y Matzinger, 2004).

Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I. En su porción citoplasmática tienen una región altamente conservada que se denomina Dominio TIR, siglas que se corresponden a Toll/IL-1R, ya que esta región también está presente en los receptores de interleuquina 1 o IL-1R (Slack et al., 2000). En la parte extracelular su estructura se caracteriza por las repeticiones ricas en leucinas (LRR) lo que los diferencia de los IL-1R.

El receptor toll-like 4 o TLR-4, fue el primero en ser descrito en humanos. Es el receptor del lipopolisacárido o LPS (Takeuchi y Akira, 2001), componente fundamental de la membrana de las bacterias Gram negativas (Gram -), aunque tiene otros ligandos como las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) o el fibrinógeno, ambos indicadores de daño celular (Ohashi et al., 2000; Gallucci y Matzinger, 2001). De hecho, su implicación en múltiples casos de la denominada “inflamación estéril” (en ausencia de patógenos) ha dado lugar a la teoría de que el

TLR-4 es un receptor centinela capaz de activar una respuesta inflamatoria tras el primer síntoma de peligro, ya sea por la presencia de LPS que indica infección como de factores de daño celular (Mollen et al., 2006).

Una vez el TLR-4 se ha unido a su ligando, se pueden activar distintas vías de señalización celular. La más estudiada, que es igual que la del IL1-R, es la vía dependiente de MyD88 (*Myeloid differentiation 88*), aunque es también muy importante la vía TRIF-dependiente (Activador de interferón asociado al receptor toll).

4.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL TLR-4

Como acabamos de ver, TLR-4 tiene numerosos ligandos. Para describir la vía de señalización de este receptor, se utilizará como modelo el caso concreto del LPS ya que es el mejor estudiado. TLR-4 reconoce específicamente la región de Lípido A del LPS bacteriano (Poltorak et al., 1998). En el caso de los demás ligandos, exógenos y endógenos, todavía se desconocen ciertos aspectos de su unión al TLR-4, la participación de otros correceptores, o la activación preferente de una de la vías de transducción (Figura 7).

El LPS de las bacterias Gram - es captado por la LBP (*LPS binding protein*), y el conjunto se une a CD14 (*cluster of differentiation 14*) que está presente en células del sistema inmune innato o se encuentra libre, soluble en plasma, en el organismo (Tobias et al., 1995). El CD14 unido a células inmunes no tiene la capacidad de transducir la señal porque carece de región intracelular, pero sí puede ceder el LPS al complejo TLR-4/MD-2 lo que activa la cascada de reacciones. Investigaciones más recientes han puesto en evidencia un papel dual de CD14; en primer lugar, actúa transportando ligandos a distintos TLRs y, en segundo lugar, amplifica la señalización moviendo estos TLRs a regiones ricas en quinasas en los *lipid raft* (Triantafilou et al., 2002; Olsson y Sundler, 2006)

El correceptor MD-2 (que se denomina *lymphocyte antigen 96*) es fundamental en el reconocimiento del LPS por el TLR-4 (Shimazu et al., 1999). Ratones deficientes de MD-2 no responden frente al LPS (Nagai et al., 2002). El papel fundamental de esta proteína se debe a que no sólo interviene en el reconocimiento del LPS, sino que previamente facilita la activación del TLR-4 y su desplazamiento hasta la superficie celular (Miyake et al., 2002).

En resumen, el primer paso de la vía es la asociación de CD14/TLR-4/MD-2 en la membrana, formando un complejo receptor del LPS (Da Silva Correia et al., 2001), lo que desencadena una de las dos posibles vías de señalización descritas a continuación.

4.2.1 Vía dependiente de MyD88

El dominio TIR citoplasmático del TLR-4 se une al MyD88 que es una proteína adaptadora y, al interactuar con el TLR, recluta a IRAK4 (quinasa asociada a IL-1).

La IRAK4 recluta y activa a su vez a TRAF6 (factor asociado al receptor de TNF). La asociación de MyD88, IRAK y TRAF6 da lugar al denominado Complejo 1 (Cao et al., 1996).

Este complejo se disocia del TLR y una vez libre se une con un grupo de proteínas TAK 1 (Quinasa asociada a $TGF\alpha$), y con TAB1, 2 y 3 (proteína unida a TAK). El complejo 1 junto con estas proteínas forman el Complejo 2.

Las interacciones entre las proteínas del Complejo 2 inducen a la fosforilación de varios de sus componentes lo que permite que se activen dos posibles vías:

1. La TAK 1 fosforilada activa a IKK (complejo de kinasas de $I\kappa B$) que fosforila a $I\kappa B$, lo que induce su degradación vía proteosoma. De este modo el factor de transcripción NF- κB al que estaba unido, queda libre para trasladarse al núcleo y actuar como factor de transcripción (Delaney et al., 2006). De este modo activa la expresión de un conjunto de genes proinflamatorios tales como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la interleuquina 1 beta o 6 (IL-1 β , IL-6) o el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α).

2. El TRAF6 activa a las MAPKs (proteínquinas activadas por mitógenos) fosforilándolas. Estas quinasas son las siguientes:

- ERK (quinasa regulada por señales extracelulares)
- Quinasa p38
- JNK (quinasa C-jun del extremo N-terminal)

Las MAPKs regulan a su vez la activación nuclear de factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) (rev en Plotnikov et al., 2011) (Figura 7).

Se observó que en presencia de LPS la activación de las MAPK y del NF- κ B permanece intacta en macrófagos deficientes de MyD88 (Adachi et al., 1998), lo que indicaba que la respuesta a LPS puede ser mediada también por una vía independiente de MyD88, que es la vía TRIF-dependiente que se describe a continuación.

4.2.2. Otras vías de señalización

Existe otra vía de transducción, que se desencadena a través de otras proteínas adaptadoras.

Las proteínas adaptadoras que pueden desencadenar una señalización independiente de MyD88 son: TRAM (Molécula asociada al receptor toll) y TRIF (Activador de interferón asociado al receptor toll). Estos adaptadores dimerizan de dos maneras posibles dando lugar a distintas vías de señalización:

- Se puede formar el heterodímero TRAM-TRIF: activa la vía de TRAF6-TAK1-IKK, etc., que hemos descrito anteriormente.
- También se puede formar el homodímero TRIF-TRIF: a través de la quinasa TBK1 activan el factor de regulación del interferón (IRF3) que activa la producción de interferón 1 (IFN1) sobre todo del tipo β , de caspasas y de moléculas coestimuladoras.

El interferón a su vez actúa sobre sus receptores de membrana activando la vía STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) y los genes correspondientes (Figura 7).

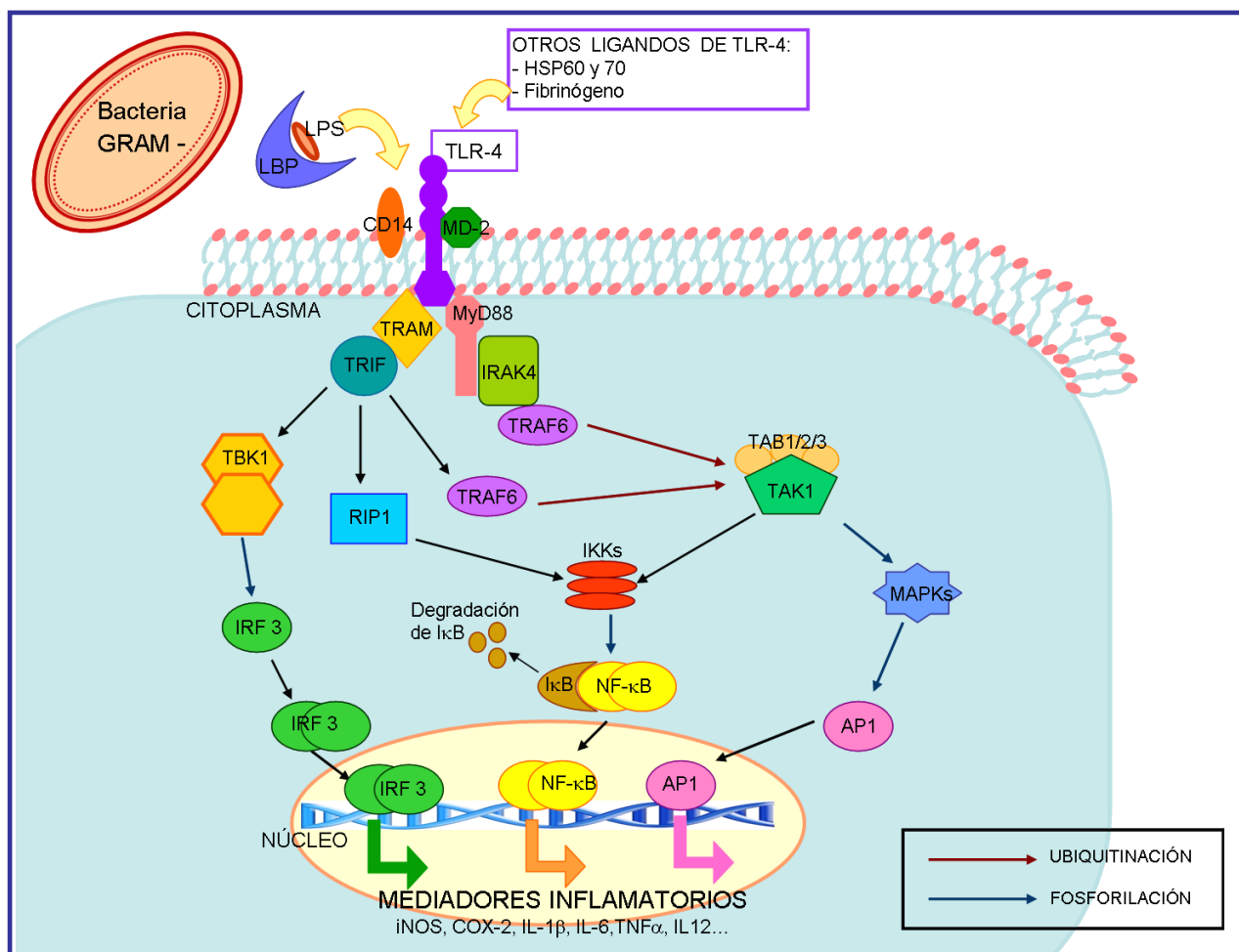


Figura 7. Esquema de las vías de señalización intracelular del TLR-4.

TLR-4 induce una compleja respuesta inflamatoria que alerta al organismo frente a una infección o un daño tisular. Parece que el complejo TLR-4/MD-2 no permanece en la superficie celular, sino que es endocitado al interior celular, una vez se ha estimulado (Fujihara et al., 2003). Este es uno de los mecanismos que regulan el proceso inflamatorio para que no sea excesivo. Una sobreactivación de este sistema puede conllevar, en casos de infecciones bacterianas, a síndromes clínicos como el shock séptico. Existen también múltiples mecanismos celulares para inhibir la activación de TLR-4 (Liew et al., 2005) como, por ejemplo, los inhibidores endógenos, entre los que se encuentran la ubiquitina ligasa TRIAD3A, que se une al dominio citosólico de TLR-4 y activa su ubiquitinación y degradación (Chuang y Ulevitch, 2004), o la proteína RP105 homóloga del TLR-4, que interacciona con este receptor en la superficie celular y disminuye su señalización (Divanovic et al., 2005).

4.3. TLR-4 EN EL SNC

Durante mucho tiempo se pensó que el cerebro era un órgano inmunológicamente privilegiado, incapaz de desarrollar una respuesta inmune; sin embargo hoy ya no se pone en cuestión la capacidad del SNC para activar una respuesta inmune.

La microglía son las células inmunes residentes del SNC, y en ellas se expresa el TLR-4, lo que parece lógico porque se trata de un receptor inmune (Lehnardt et al., 2003). No obstante, su expresión no se limita a la microglía. Se sabe que las neuronas expresan TLR-4 (Tang et al., 2008) entre otros componentes del sistema inmune, como otros TLRs o moléculas de clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH). También se ha demostrado la presencia de TLRs en astroglia (Olson y Miller, 2004; Jou et al., 2006; Caso et al., 2007) y, en pequeñas cantidades en condiciones basales, en células endoteliales de la vasculatura cerebral (Singh y Jiang, 2004; Nagyoszi et al., 2010). Esto confirma que el SNC puede desencadenar una respuesta inmune innata frente a infecciones o frente a daño cerebral.

Aunque distintos tipos celulares expresen receptores inmunes en el parénquima del SNC, existe una mayor concentración de estos en las zonas carentes de barrera hematoencefálica (BHE) (órgano subfornical, eminencia media, área postrema) y en el plexo coroideo y en las meninges (Lacroix et al., 1998; Laflamme y Rivest, 2001). Su activación es fundamental en la comunicación entre el SNC y el resto del organismo. Se estimulan cuando hay una infección periférica que no llega al SNC, pero activa en estas regiones los TLRs que producen mediadores proinflamatorios. Al carecer de BHE, las citoquinas pueden entrar en el SNC por difusión, y activar la microglía (rev. en Dantzer et al., 2008).

La activación de la microglía es un tema muy controvertido. La inflamación inducida por la microglía puede amplificarse, causando estrés oxidativo y daño en otros tipos celulares, especialmente neuronas (Block y Hong, 2007). Como la activación de la microglía depende en parte del TLR-4, éste puede estar implicado en la neurotoxicidad que aparece en distintas patologías del SNC. Algunos autores sugieren que el TLR-4 es directamente responsable de la muerte neuronal (Tang et al., 2008). Pero conocer si realmente la activación de este sistema es beneficioso o dañino es mucho más complejo, y es uno de los objetivos de la serie de trabajos que conforman esta Tesis Doctoral.

5. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

5.1.1. Relación entre comportamiento y sistema inmune

La comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema inmune constituye un sistema regulador de retroalimentación o *feedback*.

Un ejemplo de la comunicación establecida entre ambos sistemas lo constituyen algunas citoquinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), que son mediadores inflamatorios y actúan sobre ciertos sustratos neuronales, de manera que desencadenan el comportamiento conocido como *sickness behaviour*. Se trata de un conjunto de cambios comportamentales adaptativos que desarrollan los individuos durante el curso de una infección, normalmente acompañados de fiebre. Estas respuestas incluyen letargo, depresión, anorexia, sueño, hiperalgesia, disminución del acicalamiento o *grooming* en roedores y fallo en la capacidad de concentración. Normalmente es adaptativo y resulta beneficioso para el organismo.

Como se explicó anteriormente, los pacientes con depresión presentan niveles elevados de citoquinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y IL-6) que podrían estar contribuyendo a los síntomas de esta enfermedad. El $\text{TNF}\alpha$ es la primera citoquina liberada por el sistema inmune innato para controlar la respuesta inflamatoria. Una vez liberada puede influir en varias funciones cerebrales, difundiendo al parénquima en regiones desprovistas de barrera hematoencefálica o activando neuronas periféricas. También activa su propia síntesis *de novo* en neuronas y glia.

Existe un gran número de estudios que demuestran que la administración de $\text{IL-1}\beta$ o $\text{TNF}\alpha$ en ratas y ratones, induce un conjunto de signos comportamentales de forma dosis-dependiente. Los animales permanecen en una esquina de la jaula y no muestran interés en su ambiente social o físico, a menos que se les estimule. Presentan menor actividad motora, menor ingesta de agua y comida, trastornos del sueño y alteración cognitiva. Este conjunto de síntomas se corresponden con el anteriormente citado *sickness behaviour* (Lacosta et al., 1999). Hace años se descubrió, en pacientes tratados con las citoquinas recombinantes IL-2 e $\text{IFN}\alpha$ para eliminar tumores que resistían a la quimioterapia y radioterapia, la presencia de graves cambios neuropsiquiátricos, entre ellos depresión mayor, en un número significativo de

pacientes (Denicoff et al., 1987; Renault et al., 1987). Se estudió de forma exhaustiva los síntomas que presentaban pacientes con cáncer tratados con inmunoterapia, y se confirmó que eran consecuencia del tratamiento. Estos síntomas se podían clasificar en dos categorías: aparición temprana de síntomas de depresión neurovegetativos y somáticos, en todos los pacientes (síntomas parecidos a gripe, fatiga, anorexia, dolor y trastornos del sueño) y síntomas psicológicos de depresión de aparición tardía y que aparecen sólo en la mitad de los pacientes (alteraciones cognitivas ligeras, carácter depresivo, a veces acompañado de ansiedad e irritabilidad) (Capuron et al., 2000; Capuron et al., 2002; Constant et al., 2005). El pretratamiento con paroxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina) revierte los síntomas psicológicos. Además, los pacientes que desarrollaron síntomas psicológicos, mostraron una puntuación mayor en la escala de valoración de la depresión Montgomery-Asberg, al medir la depresión antes del comienzo del tratamiento (Capuron y Ravaut, 1999) y tuvieron una mayor respuesta HPA tras la primera inyección de IFN α (Capuron et al., 2003), sugiriendo que la vulnerabilidad a la depresión inducida por inmunoterapia está mediada por factores de riesgo psicológicos y fisiológicos.

5.1.2. Traslocación bacteriana intestinal

El estrés produce una “inflamación directa”, mediada por citoquinas y mediadores inflamatorios y oxido/nitrosativos, que también podríamos denominar endógena no sólo en SNC, como hemos descrito anteriormente, sino en otros órganos. La mucosa gastrointestinal se ve modificada tras la exposición a estrés, un hallazgo clásico desde el trabajo inicial de Selye en 1936.

Sin embargo, en los últimos años, se han presentado datos sobre la participación de elementos bacterianos exógenos, como responsables de inflamación tras estrés.

Trabajos anteriores llevados a cabo en el grupo de investigación donde se ha realizado la presente Tesis Doctoral demostraron que, tras exposición a estrés por inmovilización, se encontraban microorganismos viables procedentes de la flora intestinal en los órganos internos de la rata (Ponferrada et al., 2007). La capa celular epitelial, en el intestino delgado y en el grueso, está interconectada gracias a las uniones intercelulares estrechas o “*tight junctions*”, restringiendo la permeabilidad (rev. en DeMeo et al., 2002).

La exposición a estrés agudo por inmovilización induce una fuerte respuesta inflamatoria en el tracto gastrointestinal y la ruptura de las uniones estrechas del epitelio intestinal, lo que conlleva una disfunción de la barrera epitelial, permitiendo el paso de las bacterias presentes en sistema digestivo hacia el organismo, que se conoce como traslocación bacteriana intestinal o *Leaky gut* (en inglés). Este fenómeno se ha podido observar en varios estudios con distintos modelos de estrés (Mazzon et al., 2002; Demaude et al., 2006). Se ha demostrado la implicación de los glucocorticoides endógenos en la permeabilidad gastrointestinal inducida por estrés en ratas (Meddings y Swain, 2000).

La dexametasona, un glucocorticoide exógeno, es capaz de alterar la inmunidad humoral de la mucosa intestinal, produciendo un aumento de inmunoglobulina A (IgA) en plasma, y una disminución en secreciones salivares y vaginales, debido a una redistribución desde la mucosa al plasma (Wira et al., 1990). La IgA en las mucosas es la primera línea de defensa, su disminución a este nivel, implica un descenso de la protección en los órganos cubiertos por mucosas. Del mismo modo, los glucocorticoides liberados en la respuesta al estrés podrían alterar esta inmunidad. Estudios previos del grupo de investigación de la presente Tesis Doctoral, pusieron en evidencia una disminución de la IgA en el colon de los animales sometidos a estrés agudo, lo que propiciaría el paso de bacterias procedentes del colon a los órganos linfoides, el bazo o el hígado (Ponferrada et al., 2007).

La traslocación bacteriana no sólo se ha observado en protocolos experimentales de estrés, también se ha visto en pacientes con depresión (Maes et al., 2008). Se ha comprobado que estos pacientes presentan un aumento de la permeabilidad gastrointestinal, lo que permitiría la traslocación al organismo de bacterias Gram -. Este aumento de la traslocación participaría en la fisiopatología inflamatoria de la depresión. Así, se ha apreciado la activación de la respuesta inflamatoria en el suero frente a diversos microorganismos, lo que sugiere que el aumento del LPS activa la respuesta inmune, pudiendo inducir los síntomas ya citados del "*sickness behaviour*" (Maes et al., 2008).

5.1.3. TLR-4 y estrés

La relación que existe entre el TLR-4 y el estrés se ha comenzado a estudiar recientemente y la mayor parte de los datos se han obtenido mientras se realizaba esta Tesis, a partir de 2008.

En primer lugar, se demostró que el TLR-4 se expresa en la corteza de las glándulas adrenales del ser humano (Bornstein et al., 2004). Posteriormente se observó que la presencia de LPS activa la secreción de cortisol por parte de células adrenales a través del TLR-4, mediante la activación de la vía de NF- κ B, COX-2 y PGE₂. El bloqueo de esta vía inhibe la secreción de glucocorticoides en presencia de LPS (Vakharia y Hinson, 2005; Martínez Calejman et al., 2011). De manera que, en una infección bacteriana, el aumento de glucocorticoides en plasma se debe, al menos en parte, a la acción directa del LPS en las glándulas adrenales. No obstante, hay otras posibles causas de este aumento. En un proceso infeccioso, el eje HPA se activa y culmina con la liberación de glucocorticoides. Esta activación del eje se debe también a la acción del TLR-4, pero esta vez a nivel del sistema vascular del cerebro. El LPS circulante, sin necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica, activa al TLR-4 que se encuentra en el endotelio del sistema vascular del SNC, de manera que se activan su vía de señalización intracelular dependiente de MyD88, que termina con la activación del eje HPA y la secreción de glucocorticoides (Gosselin y Rivest, 2008).

Por otro lado, los animales carentes de TLR-4 funcional, tienen alteradas la estructura y la función de las glándulas adrenales (Zacharowski et al., 2006). Ratones transgénicos, *knock-out* de TLR-4, presentan una hipertrofia de sus glándulas adrenales, niveles elevados de corticosterona basal, que no aumenta en presencia de LPS.

Diversos estudios han puesto en evidencia, que la secreción de glucocorticoides en presencia de LPS se atenúa por preconditionamiento, que puede consistir en un pretratamiento con dosis bajas de LPS o de ACTH (Liu et al., 2011). Sin embargo, otros estudios muestran que un pretratamiento con glucocorticoides exógenos, aumenta la neuroinflamación inducida por LPS en el hipocampo (Frank et al., 2010).

En el laboratorio en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral, se estudió cómo afectaba el estrés a animales genéticamente modificados, que presentan un TLR-4 no funcional. Se observó que la presencia en corteza prefrontal de mediadores

oxidativos/inflamatorios tras la exposición al estrés, era menor que en los animales *wild type* (Caso et al., 2008).

La relación entre estrés y TLR-4, también se da en sentido inverso. Los glucocorticoides y las catecolaminas actúan sobre los macrófagos, inhibiendo su capacidad de respuesta, al disminuir la expresión de mRNA de TLR-4 (Du et al., 2012). Este mecanismo refuerza el papel inmunosupresor de los glucocorticoides, y del estrés en la periferia.

5.1.4. Justificación del estudio

El estrés, como se ha visto en apartados anteriores, causa neuroinflamación, y ésta, se relaciona con numerosas enfermedades que afectan al SNC, pudiendo empeorar o incluso favorecer la aparición de estas patologías. Además, cuando el estrés es demasiado intenso o duradero, contribuye al desarrollo de un gran número de enfermedades que afectan prácticamente a todos los sistemas del organismo. Es por lo tanto importante conocer todos los mecanismos desencadenados en respuesta al estrés.

En este estudio nos centramos en una patología especialmente relacionada con el estrés, como es la depresión. Aunque existen distintos tratamientos, en un porcentaje importante de los pacientes no son capaces de revertir los síntomas (Trivedi et al., 2006; Sinyor et al., 2010). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la depresión afecta a 121 millones de personas en el mundo y causa la muerte de 850.000 personas al año por suicidio. La OMS estima que en 2030 esta enfermedad será la primera causa de invalidez (AVAD). Todos estos datos nos advierten de la magnitud del problema y de la importancia de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad, así como de la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas.

Este estudio se ha realizado en diversos modelos de estrés, uno agudo, uno sub-crónico y otro crónico, que es el modelo de depresión más utilizado a nivel de investigación pre-clínica. De manera que podamos ver cómo evolucionan los parámetros oxidativos/inflamatorios, según se cronifica la exposición al estrés y el papel del TLR-4 en estos procesos.

5.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los aspectos tratados en la Introducción se podrían resumir en los siguientes puntos:

1. El estrés induce una respuesta inflamatoria en el SNC, con activación de la vía del NF- κ B, y la producción de iNOS, COX-2 y citoquinas proinflamatorias en la corteza prefrontal (García-Bueno et al., 2008).

2. La exposición a estrés induce una disfunción de las uniones estrechas intercelulares de la barrera intestinal, que deja paso a los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal hacia el interior del organismo, lo que se conoce como traslocación bacteriana intestinal (Ponferrada et al., 2007).

Esta translocación bacteriana, como se ha citado anteriormente, también se ha observado en pacientes con depresión mayor (Maes et al., 2008).

3. El TLR-4 es el receptor innato del LPS de las bacterias Gram -, y su vía de señalización incluye la activación del NF- κ B y la producción de mediadores inflamatorios. Esta señalización se produce en corteza prefrontal, cuando el LPS está presente en la circulación sistémica.

4. Animales genéticamente modificados carentes de TLR-4 funcional (C3H/HeJ), presentan una menor expresión en corteza cerebral de las enzimas proinflamatorias COX-2 e iNOS tras estrés por inmovilización (Caso et al., 2008).

Basándonos en estas observaciones, planteamos la siguiente hipótesis (Figura 8):

“La neuroinflamación observada en la corteza prefrontal de animales sometidos a estrés se debe, al menos en parte, a la activación de los TLR-4 por componentes bacterianos traslocados a través de la barrera intestinal.”

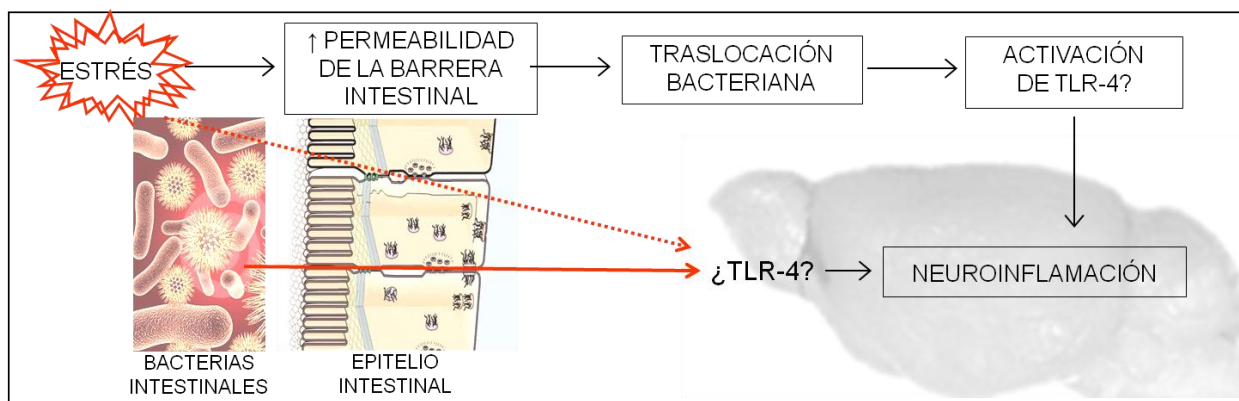


Figura 8. Representación de la hipótesis.

Para verificar esta hipótesis se propusieron los siguientes objetivos generales, que se dividen en distintos objetivos específicos:

OBJETIVOS GENERALES:

- I. Analizar el efecto del estrés sobre la vía del receptor Toll-like 4 en corteza prefrontal.
- II. Determinar si la traslocación bacteriana intestinal inducida por estrés está implicada en la activación del receptor Toll-like 4 en corteza prefrontal.
- III. Estudiar el papel del receptor Toll-like 4 en la neuroinflamación inducida por distintos modelos de estrés en rata y ratón.
- IV. Analizar la implicación del receptor Toll-like 4 en la secreción de corticosterona durante la respuesta al estrés.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Analizar la respuesta temporal al estrés por inmovilización en rata en relación con la vía del receptor Toll-like 4.
2. Determinar el tiempo de exposición a estrés necesario para la activación de la vía del receptor Toll-like 4.
3. Estudiar en un protocolo de estrés agudo en rata los efectos de un bloqueo farmacológico del receptor Toll-like 4 sobre: la respuesta general a estrés, la traslocación bacteriana intestinal y la neuroinflamación en corteza prefrontal.
4. Evaluar las diferencias en la neuroinflamación inducida por estrés en un modelo de estrés subcrónico en animales carentes de receptor Toll-like 4 funcional.
5. Comprobar si la traslocación bacteriana intestinal participa en la activación del receptor Toll-like 4 en un modelo de estrés subcrónico en ratón.
6. Analizar la respuesta inflamatoria en corteza prefrontal en un protocolo de estrés crónico impredecible en rata (CMS).
7. Determinar si la traslocación bacteriana intestinal es responsable de la neuroinflamación observada en CMS.
8. Evaluar si la descontaminación intestinal tiene efectos en el comportamiento depresivo inducido por exposición a CMS.

6. ENGLISH SUMMARY

The physiologist Hans Selye defined the physiological responses to stressors and adapted the term stress from physics and engineering to its current use in the medical vocabulary. He was the first to use the terms stress and “stress response” (Selye, 1936). The stress response consists of a three-phases process that was defined by Selye as General Adaptation Syndrome (Figure 1, pg. 4). It results from the necessary adaptation to overcome situations in which an organism has to fight or flight to survive (e.g. higher blood pressure, a faster cardiac rhythm, suppression of the digestive processes, re-direction of blood to muscles). These observations came after the contributions of Walter Cannon, who called the stress-induced increase in cardiac output the “fight or flight” response. He realized the importance of adrenal hormones in this response already in 1924.

Thus, all these changes cooperate to allow the organism to detect the danger as well as to provide the required energy to survive, while depriving the organism of the necessary energy for other processes not needed to survive (rev. in Sapolsky, 1998).

The traditional physiological stress response begins when the brain detects a homeostatic challenge and activates the sympathetic nervous system (SNS), which releases the catecholamines epinephrine (E) and norepinephrine (NE). This is followed by the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: CRH (Corticotropin-releasing hormone) is synthesized by the hypothalamic paraventricular nucleus (parvocellular zone) in response to any stimuli perceived as stressor. CRH goes through hypothalamus-pituitary portal system to the anterior pituitary where it enhances the expression of proopiomelanocortin, a macropeptide precursor of ACTH (Adrenocorticotrophic hormone), β -endorphin and melanocyte stimulating hormone. Circulating ACTH increases the synthesis and release of corticoids in the adrenal glands by stimulating specific receptors. The final result is an increase in plasma glucocorticoids (GC). This axis is auto-regulated by a negative feedback mechanism through its main receptors: MR (receptors for mineralocorticoids, with high affinity and easily saturated, they are responsible for the circadian control of the axis) and GR (receptors for glucocorticoids, with less affinity, having a key role in the control of the HPA axis after stress exposure) (Figure 2, pg. 6).

Data accumulated over the past 15 years demonstrate that after stress exposure a state of inflammation in the brain takes place. First, there is a release of the excitatory aminoacids glutamate and aspartate. Released glutamate can bind to different receptors; the overactivation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype

causes the mobilization of free cytosolic calcium. Excess in the intracellular calcium concentration over-activates certain calcium-dependent enzymes resulting in the generation of oxygen radicals, protein misfolding and cytoskeletal damage, constituting the process known as excitotoxicity (Figure 3, pg. 13).

Although typically used in pharmacology due to its anti-inflammatory and immunosuppressory actions, glucocorticoids can also contribute to neuroinflammation. The antiinflammatory classical paradigm has been supplanted by an increasing recognition that the over-release of glucocorticoids might be a crucial starting mechanism on stress-induced neuroinflammation (rev. in Sorrells and Sapolsky, 2007). Glucocorticoid release leads to an inhibition of the glucose uptake in the brain, resulting in a decrease in ATP levels. This energy compromise can produce an increase in glutamate derived excitotoxicity, also potentiated by the fact that glucocorticoids increase the amount of intracellular calcium and that low ATP levels can cause the reversion of the glutamate reuptake transporters (EAATs).

In the last years the laboratory where almost all this PhD Thesis was developed focused in the study of the mechanisms by which stress increases vulnerability to oxidative/nitrosative damage in the brain. Shortly, stress mediators provoke the release of glutamate in the brain which increases excitotoxicity and induces the release of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) which activates the nuclear factor κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) pathway and induces the expression of the proinflammatory enzymes inducible NO synthase (iNOS) and inducible form of the cyclooxygenase (COX-2), among other inflammatory mediators. The result of these effects is the accumulation of oxidative and nitrosative mediators which can attack membrane phospholipids inducing lipid peroxidation and cause cell damage (rev. in García-Bueno et al. 2008) (Figure 4, pg. 21).

At the same time, stress activates compensatory mechanisms to resolve the inflammation, such as the activation of a COX-2 subpathway which leads to the increase of the antiinflammatory 15-deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ_2) or the activation of its main cellular target, the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma ($\text{PPAR}\gamma$) (García-Bueno et al, 2005a,b) (Figure 5, pg. 22).

Stress is a critical environmental trigger for the development of a great number of diseases. Specially, exposure to stress may be a precipitating factor in developing psychiatric illness, such as major depression. In fact, there are data suggesting that up to 70% of patients experience significant stress prior to the onset of their depressive symptoms (Kendler et al., 1999; Mitchell et al., 2003).

Several lines of research in human patients reveal an important relationship between excessive HPA axis activation and depression (Plotsky et al., 1998; Owens et al., 2001). There is also a connexion between GC and serotonin (5-HT), the most important neurotransmitter in the pathophysiology of major depression. The administration of 5-HT up-regulates mRNA expression of the GC receptors in hippocampus (Seckl et al., 1990), the same way as chronic stress down-regulates the receptor 5-HT_{1A} in the same CNS region (López et al., 1997).

Furthermore, an increasing body of evidence presented during the last years has shown that exposure to certain psychological experiences, including stress-induced diseases, is associated with variations in immune parameters. In separate meta-analytic reviews of studies (Herbert and Cohen 1993a, 1993b) both major depression and stress exposure were significantly associated with alterations in virtually all of the immune parameters measured. In many cases both depression and chronic stressors have been associated with decreased adaptative/acquired immunity, infection and inflammation, with important general consequences in health but in the last decade it has been demonstrated that after stress exposure or during certain episodes of depression an inflammatory/immune response is strongly activated (Raison et al., 2006; García-Bueno et al., 2008).

A question of special relevance is the consequences of these changes in the brain: although it has long been considered an 'immune-privileged' organ, this immune status is far from absolute, especially when the blood brain barrier structure or function may be affected, as is the case after stress exposure (Madrigal et al., 2002b). Data presented from experimental models and also in humans indicate a clear relationship between inflammation and stress exposure (Sorrells et al., 2009), and also depression (Dantzer et al., 2008; Miller et al., 2009).

The brain monitors peripheral immune responses by several means acting in parallel (Dantzer et al., 2008): one pathway involves locally produced cytokines activating primary afferent nerves; a second humoral pathway in which Toll-like receptors (TLRs) expressed on endothelium and macrophage-like cells residing in the circumventricular organs and the choroid plexus respond to circulating pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by producing pro-inflammatory cytokines; a third pathway comprises pro-inflammatory cytokine transporters at the blood-brain barrier; finally, a fourth pathway involves IL-1 β receptors that are located on perivascular macrophages and endothelial cells of brain venules.

Recently, several studies have focused on TLRs and their potential roles in neuropathology (Crack and Bray, 2007). The discovery that not only immune cells, but also neurons, astrocytes and resident microglia express a large majority of the 13 already identified TLRs has challenged the way neuroscience explains the role of the immune system in the brain, and as a result, the view of the brain as an immune privileged organ has been re-evaluated.

TLRs are pattern recognition receptors proposed as main agents of the innate immune response, constituting the first line of defence against invading microorganisms (rev. in Takeda et al., 2003). In this first line of protection there are pro-inflammatory receptors such as IL-1R, as well as 13 members of the TLR subfamily, expressed in both immune and non-immune cells. Their expression is not static, but is modulated rapidly in response to pathogens, a variety of cytokines and environmental stresses (Medzhitov et al., 1997; Akira et al., 2006).

Specifically, TLR-4 has been reported to have a regulator role in adrenal response to stress and inflammatory stimuli (Zacharowski et al., 2006), as well as in the brain response to stress (Caso et al., 2008). TLR-4 responds predominantly to lipopolysaccharide (LPS) from Gram negative (Gram -) bacteria (Takeuchi and Akira, 2001) through its co-receptor, myeloid differentiation protein-2 (MD-2), a requisite for LPS signaling of TLR-4 (Shimazu et al., 1999). To achieve specificity of signalling, TLRs recruit some other adapter proteins, such as, in the case of TLR-4 and other members, the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) during intracellular signal transduction. After various steps in the transduction pathway (i.e. specific kinases), the activation of prototypic inflammatory nuclear transcription factor NF- κ B or others, such as the transcription factor activator protein 1 (AP-1) is produced (Means et al., 2000). NF- κ B activation culminates in the production of NF- κ B-dependent pro-inflammatory mediators, such as the enzymes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2). Interestingly, during the last years, our group and others have described a cellular pathway in brain cells (neurons and glia) taking place after stress exposure with a key role for NF- κ B as a crucial factor in the oxidative-nitrosative damage produced after stress exposure (García-Bueno et al., 2008) (Figure 7, pg. 39).

Two major mechanisms have been proposed to activate TLR-4 after immune/inflammatory stimuli (stress exposure included): the first one is related to endogenous molecules or PAMPs, released from disrupted cells and extracellular matrix degradation products that may contribute to immune activation and inflammation after tissue injury. The second one comes from some models of stress that show increased intestinal permeability and a resultant bacterial translocation to the systemic

circulation (Mazzon et al., 2002; Demaude et al., 2006; Ponferrada et al., 2007). These circulating Gram – bacteria are a major source of LPS, which can activate brain TLR-4 through multiple pathways, inducing a neuroinflammatory response. This proposed mechanism known as “*leaky gut*” also takes place in depressive patients and it has been related to the inflammatory pathophysiology of the disease (Maes et al., 2008).

Taking into account all this background, the main goal of the present series of studies was:

To evaluate the possibility that the stress-induced neuroinflammation in the prefrontal cortex of rodents is due, at least in part, to TLR-4 activation by LPS resulting from intestinal bacterial translocation.

(Figure 8bis)

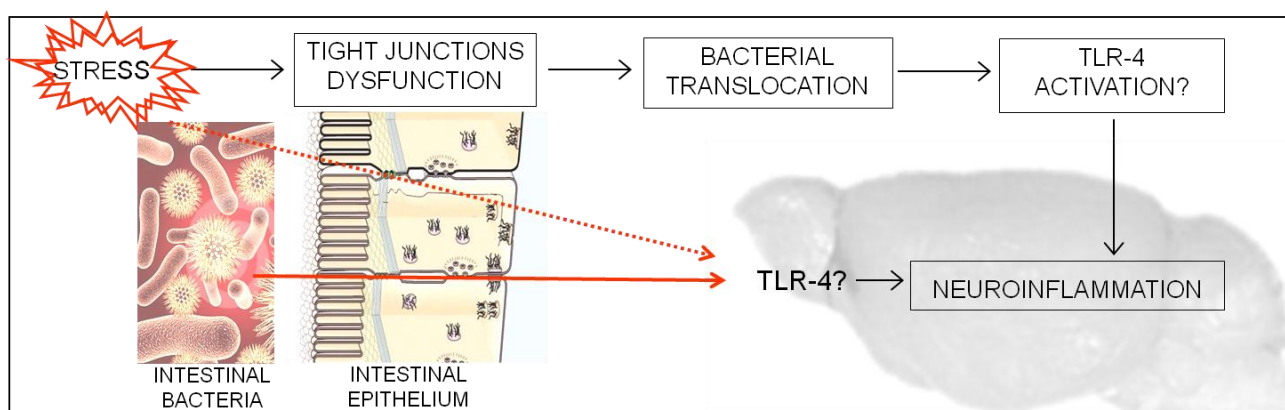


Figure 8bis. Schematic representation of the hypothesis.

To test this objective we used three different approaches:

- A pharmacological strategy in an acute stress model in rat
- A genetic strategy: TLR-4 receptor-deficient mice submitted to subchronic stress
- A chronic mild stress model in rats widely accepted as an experimental model of depression.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS ANIMALES
2. TOMA DE MUESTRAS
3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES
4. CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este apartado se describen los protocolos que se han llevado a cabo durante la realización de esta Tesis. En primer lugar se describen los distintos protocolos de estrés a los que se sometieron a los animales y que componen los tres bloques de resultados que se verán más adelante. A continuación, se explican las técnicas empleadas para la obtención de resultados.

Todos los protocolos experimentales utilizados en esta Tesis se realizaron según la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidades Complutense de Madrid y de Cádiz, y conforme a la regulación europea (2003/65/EC).

Se adjunta una copia del diploma de la “Acreditación para la utilización de animales en experimentación: categoría B” de la autora de la Tesis.

1. MODELOS ANIMALES

Todos los animales utilizados fueron estabulados en jaulas individuales bajo condiciones estándar de temperatura y humedad, con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (encendido a las 08:00) y con acceso libre a agua y comida en el CAI Animalario de la Facultad de Medicina de la UCM.

1.1. ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN EN RATA

1.1.1. Animales

Para realizar el modelo de estrés agudo por inmovilización se emplearon ratas macho de raza Wistar Hannover (no consanguíneas) adultas jóvenes, de 16 semanas aproximadamente, con pesos comprendidos entre 250 y 300g.

1.1.2. Protocolo de estrés agudo

Tras un periodo de habituación de 15 días, la inmovilización se inició a las 09:00 para evitar la influencia del ritmo circadiano. El inicio de la inmovilización es a la misma hora para todos los animales. El experimento se realiza en la misma sala donde se encontraban y consiste en inmovilizar a los animales introduciéndolos en unos conos de plástico tipo Decapicone[®] (Braintree, MA. EEUU).

Se realizó un estudio preliminar sobre distintos grupos que, dependiendo del tiempo de inmovilización, van del estrés agudo al subcrónico. El estrés más agudo consistió en una inmovilización de 2 horas, en otro grupo, duró 6 horas, y por último, se utilizó un protocolo de estrés subcrónico en el que se inmovilizaron 6 horas al día, cuatro días consecutivos. Con los resultados obtenidos de estos grupos, se escogió al de estrés agudo por inmovilización 6 horas para el estudio farmacológico.

En todos los casos, las ratas fueron inmovilizadas en sus mismas jaulas. Este tipo de estrés impide los movimientos de las extremidades, pero no se trata de una inmovilización absoluta ya que no altera la respiración ni impide la movilidad de la cola (Figura 9) (Magariños et al., 1997; Leza et al., 1998).

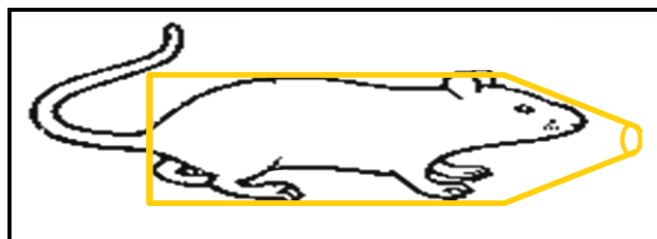


Figura 9. Esquema de la inmovilización de ratas en conos de plástico.

Los animales control no se sometieron a inmovilización y se colocaron en otra sala durante el experimento. Fueron manipulados a las 09:00 (sacar y volver a introducir al animal en su jaula), por el mismo experimentador y privados de agua y comida durante seis horas.

Justificación del modelo:

Los modelos animales de estrés pueden clasificarse en función de cuatro características:

- La primera, es la capacidad que tiene el animal de evitar la exposición al agente estresante; dependiendo de esto, el estrés será escapable o inescapable.
- El segundo factor lo determina el hecho de que se pueda, o no, anticipar la aparición y duración del estrés, lo que hará que el estrés sea predecible o impredecible.
- En tercer lugar, se tiene en cuenta la naturaleza del estímulo, se diferencia el estrés de origen físico del psicológico, existiendo modelos mixtos.
- Por último, afecta la duración del estímulo; el estrés se considerará agudo, subcrónico o crónico, según el tiempo de exposición del animal.

El método utilizado en el estudio farmacológico es una sesión de estrés por inmovilización o restricción de movimientos (en inglés “*restraint stress*”) y se puede clasificar como un modelo de estrés agudo, inescapable, impredecible y mixto físico-psicológico.

La elección del modelo de inmovilización se debe a varias razones:

1. De entre todos los modelos de estrés, los más utilizados son los caracterizados como físicos e inescapables, por ejemplo, la exposición a temperaturas extremas, privación de comida, natación forzada, choques eléctricos o la inmovilización. Existen otros modelos menos utilizados por su difícil interpretación, como los modelos de estrés social o emocional (aislamiento, lucha, hacinamiento...) (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

2. Siguiendo las recomendaciones del *National Center for the Study of Post-Traumatic Stress Disorder* (EEUU), los estímulos estresantes de tipo inescapable, como el que se ha utilizado, son los más útiles en el estudio del SEPT, de la depresión y de procesos neurodegenerativos relacionados (Telner y Singhal, 1984; Bremner et al., 1997).

3. Otro de los motivos por los que se utiliza el modelo de estrés por inmovilización es que es fácilmente repetible y se puede usar en un modelo de estrés crónico (Poland et al., 1999).

A los motivos citados podemos añadir que el modelo de estrés agudo por inmovilización es el que se ha venido utilizando tradicionalmente en nuestro grupo de investigación, de manera que existe un elevado dominio de la técnica y una importante cantidad de resultados previos (rev. en García-Bueno et al., 2008).

1.1.3. Grupos experimentales

Para estudiar el papel del receptor de inmunidad Toll-like 4 en el estrés agudo utilizamos un inhibidor de este receptor que es un derivado ciclohexeno cuya formula es la siguiente: Etil (6R)-6-[N-(2-Cloro-4-Fluorofenil) sulfamoil] ciclohex-1-ene-1-carboxilato (li et al., 2006).

Este inhibidor se conoce como TAK-242 y fue sintetizado por *Takeda Pharmaceutical Company Limited* (Osaka, Japan), en España sus nombres comerciales son CLI-095 y Resatorvid (Figura 10).

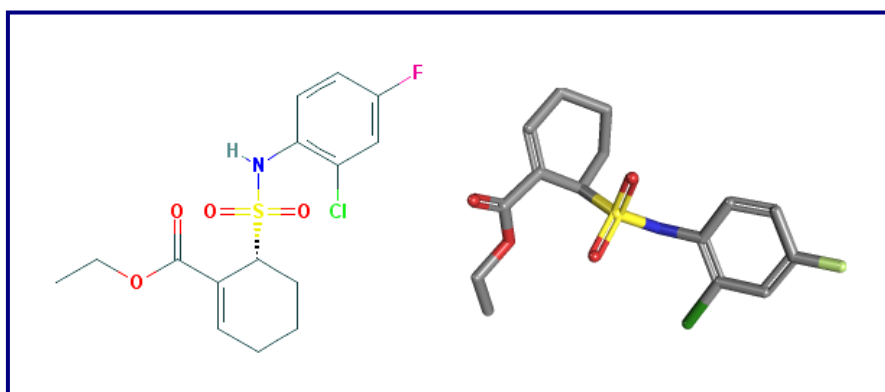


Figura 10. Fórmula molecular del TAK-242 y su representación en un modelo de barras en 3D.

El TAK-242, actúa inhibiendo de manera específica la vía de señalización de TLR-4, bloqueando su dominio intracelular pero sin interferir en la unión extracelular al lipopolisacárido (LPS), de manera que se da la unión a sus ligandos, pero esta no desencadena la cascada de señalización intracelular (Kawamoto et al., 2008). El bloqueo se da por unión del TAK-242 al dominio TIR del TLR-4, a la altura de la cisteína 747 (Takashima et al., 2009). Por lo tanto, el mecanismo por el cual el inhibidor TAK-242 es el impedimento de la señalización intracelular al bloquearse la unión con sus proteínas adaptadoras (Matsunaga et al., 2011).

En estudios *in vivo* se ha comprobado que en presencia del LPS, el TAK-242 tiene efecto terapéutico, pues disminuye multitud de parámetros proinflamatorios y oxidativos, así como el índice de mortalidad (Sha et al., 2007). Estos estudios indican que el inhibidor es efectivo a partir de una dosis de 0,5mg/kg, por lo que es la dosis utilizada en nuestro caso, preparado de la siguiente manera: 1mg de inhibidor se diluyó en 100 μ L de DMSO y a continuación la dilución fue rebajada con 2,9mL de solución salina al 0,9%, la concentración final del DMSO es 33 μ L/mL y la de inhibidor es 0,33mg/mL. Se inyectaron entre 450 y 550 μ L, según el peso del animal, por vía intravenosa en la cola al inicio del estrés.

El grupo control recibió una inyección intravenosa de vehículo que consistió en una solución de DMSO en solución salina al 0,9% (33 μ L/mL).

Los animales se dividen en seis grupos dependiendo del tiempo de exposición a estrés (animales por grupo, n=6/8):

El primer estudio se realizó en los siguientes grupos:

1. **CONTROL**
2. **STRESS 2h**: 2h de inmovilización
3. **STRESS 6h**: 6h de inmovilización
4. **STRESS 4d**: 4 días/6h de inmovilización al día

Los distintos tiempos de exposición a estrés, se representan en la Figura 11.

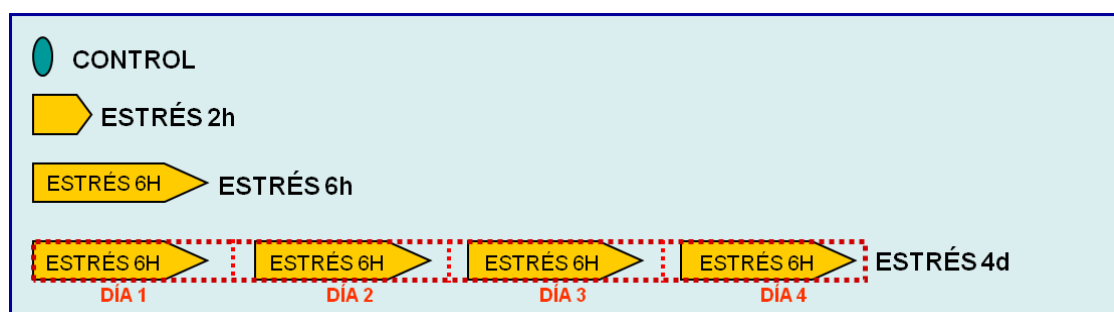


Figura 11. Esquema de los distintos protocolos de estrés agudo.

El estudio farmacológico se realizó en los siguientes grupos:

1. **CONTROL:** Vehículo intravenoso (i.v.).
3. **STRESS 6h:** Vehículo i.v. + 6h de inmovilización
5. **C(TAK):** TAK-242 i.v.
6. **S(TAK):** TAK-242 i.v. + 6h de inmovilización

1.2. ESTRÉS SUBCRÓNICO EN RATÓN

1.2.1. Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa C3H adultos jóvenes de 25-30g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EEUU). Para estudiar el papel del receptor TLR-4 en el estrés subcrónico se escogieron los ratones C3H/HeJ, que presentan una mutación espontánea. Esta mutación se da de forma natural en el tercer exón del gen del TLR-4, produciendo un cambio de una prolina por una histidina en la posición 712 de la cadena polipeptídica. Este cambio de amino-ácidos implica que el receptor se sintetiza pero no es funcional, pues el sitio de unión al LPS presenta una configuración que impide que TLR-4 y LPS se acoplen.

Estos animales se caracterizan por una resistencia al LPS y una tendencia a desarrollar infecciones por bacterias Gram -, siendo el resto de sus funciones inmunes normales (Poltorak et al., 1998).

El grupo control lo forman animales *wild type* (WT) de esta cepa, conocidos como C3H/HeN y cuyo receptor TLR-4 es funcional.

A partir de este momento y con el fin de facilitar la lectura, estos animales se denominarán **HeN** para los WT y **HeJ** los que presentan la mutación.

1.2.2. Protocolo de estrés subcrónico

Los ratones fueron inmovilizados en tubos de 50mL tipo Falcon[®], con una longitud de 11.5cm y con un agujero en el tapón para acomodar la cola del animal (Flint et al., 2003; Lauterborn, 2004). La ventilación se facilitó con varios orificios a la altura de la cabeza.

Los tubos fueron colocados y fijados en las jaulas de los animales. La inmovilización duró 2 horas, de 13.00 a 15.00 y se repitió durante 4 días. Durante la inmovilización los ratones fueron expuestos a estrés acústico con un baño de ultrasonidos (entre 19 y 25kHz con 0–35dB) (Kiank et al., 2006; Depke et al., 2008; Olfe et al., 2010).

Los animales control no fueron sometidos a estrés, se les manipuló unos segundos a las 13.00 y se les retiró el acceso a la comida y el agua durante dos horas los cuatro días que duró el experimento.

Justificación del modelo:

Este modelo de estrés de restricción y acústico se clasifica como subcrónico mixto físico y psicológico, predecible e inescapable.

Al igual que para el estrés agudo en rata, en ratón los modelos de estrés inescapables son los más adecuados para estudios sobre SEPT, de la depresión y de procesos neurodegenerativos relacionados.

Esta combinación de agentes estresantes es muy común en ratones, se trata de un modelo muy utilizado y se ha observado que es adecuado para el estudio de los efectos neuroquímicos del estrés en las funciones cerebrales. Algunos autores han estudiado la inmovilización y el estrés acústico por separado y de manera combinada, observando que las respuestas son más reproducibles cuando se combinan (Qiu et al., 1999). Además, este modelo de estrés se ha utilizado en estudios en los que se ha relacionado con un aumento en la permeabilidad colónica (Qiu et al., 1999; Ferrier et al., 2003).

De nuevo, el modelo escogido para ratón, es el que más se ha utilizado en el laboratorio donde se ha realizado esta Tesis Doctoral, de manera que existen resultados previos además de un importante dominio de la técnica (Zoppi et al., 2011).

1.2.3. Grupos experimentales

En total se crearon once grupos (número de animales por grupo, n=6-8) según el objetivo del estudio.

1. Con el fin de poner de manifiesto que el LPS circulante en la periferia inducía la producción de proteínas proinflamatorias y oxidativas en la región cerebral estudiada y que esta producción se debía al receptor del LPS, el TLR-4, se inyectó LPS de *E.coli* (Sigma) por vía intraperitoneal (i.p.). La dosis fue de 0,1mg/Kg disuelta en solución salina 0,9%. El vehículo para el grupo control fue una inyección intraperitoneal de solución salina. El sacrificio de los animales se realizó dos horas después de la inyección.

Los grupos utilizados fueron los siguientes:

1. **CONTROL(HeN):** C3H/HeN + Vehículo
2. **HeN+LPS:** C3H/HeN + LPS 0,1mg/kg i.p.
3. **HeJ+LPS:** C3H/HeJ + LPS 0,1mg/kg i.p.

2. Para estudiar el papel del TLR-4 en la neuroinflamación inducida por el modelo de estrés que se ha descrito en el apartado anterior, se utilizaron los siguientes grupos.

4. **CONTROL(HeN):** CONTROL (C3H/HeN)
5. **STRESS(HeN):** ESTRÉS 2h/4días (C3H/HeN)
6. **CONTROL(HeJ):** CONTROL (C3H/HeJ)
7. **STRESS(HeJ):** ESTRÉS 2h/4días (C3H/HeJ)

3. Los datos de traslocación bacteriana intestinal se analizaron en ratones HeN/HeJ sometidos al mismo protocolo de estrés que, esta vez duró dos días. Los controles son los mismos que en el análisis anterior.

4. **CONTROL(HeN):** CONTROL (C3H/HeN)
8. **STRESS 2d (HeN):** ESTRÉS 2h/2días (C3H/HeN)
6. **CONTROL(HeJ):** CONTROL (C3H/HeJ)
9. **STRESS 2d (HeJ):** ESTRÉS 2h/2días (C3H/HeJ)

Los distintos tiempos de exposición a estrés se representan esquemáticamente de la siguiente forma (Figura 12):

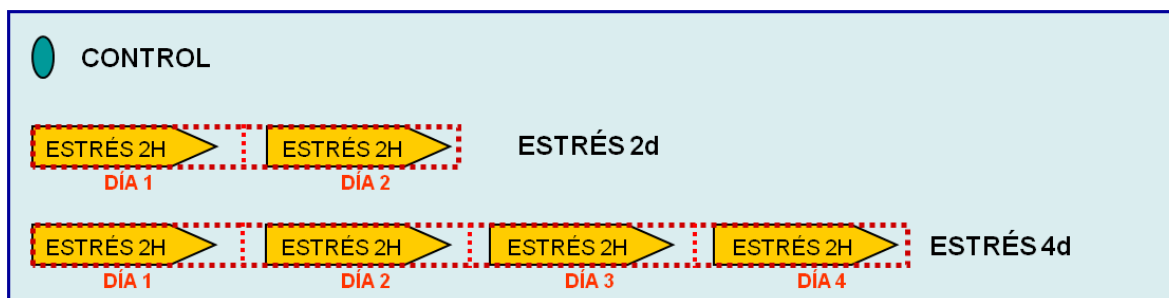


Figura 12. Esquema de los distintos protocolos de estrés agudo.

4. Con el fin de estudiar el papel que tienen las bacterias intestinales en este modelo de estrés, se realizó un protocolo de descontaminación intestinal. Para llevarlo a cabo, se utilizaron únicamente ratones *wild type* a los que se administró, el antibiótico elegido, desde el primer día y durante los cuatro días que duró el experimento por vía oral. El antibiótico utilizado fue ciprofloxacina 100mg/L (Fluka) con sacarosa 20mg/L diluidos en el agua de bebida; el grupo control en este caso recibió agua. Este protocolo de descontaminación está descrito en otros estudios (Velders et al., 2004) donde se observa que los ratones a los que se administra ciprofloxacina a través de la bebida, presentan heces sin bacterias Gram -, lo que demuestra que se ha dado descontaminación del tracto gastro-intestinal para estas bacterias. Sin embargo, los animales tratados con otros antibióticos siguen presentando estas bacterias en heces. De manera que la ciprofloxacina es el mejor de los antibióticos ensayados para descontaminar el intestino de ratón.

Los nuevos grupos que se crearon se describen a continuación y se comparan con los grupos 4 y 5 explicados anteriormente:

10. **CONTROL+ATB:** CONTROL (HeN) + ANTIBIÓTICO

11. **STRESS+ATB:** ESTRÉS (HeN) + ANTIBIÓTICO

1.3. ESTRÉS CRÓNICO EN RATA, “*CHRONIC MILD STRESS*” (CMS)

1.3.1. Animales

En el modelo de depresión inducida por estrés *Chronic Mild Stress* (CMS), los animales utilizados fueron ratas macho de raza Sprague-Dawley (no consanguíneas) adultas jóvenes (6-7 semanas) con un peso medio de 150g al principio del experimento.

1.3.2. Protocolo de estrés crónico

En nuestro caso, las ratas fueron sometidas durante 21 días a una serie aleatoria de estímulos estresantes, para evitar la habituación. En un mismo día los animales estaban expuestos a dos tipos de estímulos estresantes distintos y consecutivos, salvo un día a la semana en el que no están en presencia de ningún estímulo estresante. Este experimento se realizó en los laboratorios del Departamento de Farmacología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

A continuación se detallan los estímulos estresantes empleados, todos se mantuvieron 12 horas:

- **Emparejar:** Consiste en poner dos animales en la misma jaula, un mismo animal tendrá que ser visitante y visitado a lo largo de la semana.
- **Jaula inclinada:** Las jaulas se colocan en un ángulo de 45°C.
- **Serrín húmedo:** Verter 250mL de agua en el serrín de cada una de las jaulas.
- **Iluminación Estroboscópica:** 150 flashes /min.
- **Privación Agua/Comida:** Retirar los biberones y la comida.
- **Luz intermitente:** 2h luz/2h oscuridad durante las 12 horas

En la Tabla 1 se representa la organización de los estímulos estresantes en una semana de CMS:

	lunes	martes	miércoles	jueves	viernes	Sábado	Domingo
08.00	Emparejar A visita B	Serrín húmedo	Emparejar B visita A	Ni Agua Ni comida	Jaula inclinada	Descanso	Descanso
20.00	Luz intermitente	Ni Agua Ni comida	Jaula inclinada	Serrín húmedo	Luz estroboscópica	Luz intermitente	Ni Agua Ni comida

Tabla 1. Orden de los distintos estímulos estresantes a los que se someten los animales en una semana.

Justificación del modelo:

En este caso se trata de un estrés crónico, mixto físico psicológico, impredecible e inescapable.

Desde que se usó por primera vez (Willner et al., 1987), el CMS se ha considerado uno de los mejores modelos animales de depresión. La elección de este modelo se debe a que su validez aparente, de constructo y predictiva, se han demostrado en un gran número de estudios (Willner, 1997):

1. Validez de constructo: Los síntomas depresivos aparecen tras una exposición crónica a estímulos estresantes. Del mismo modo, el estrés está relacionado con la aparición de síntomas depresivos en humanos.

2. Validez aparente: La mayoría de los síntomas de la depresión se han puesto en evidencia en este modelo, como la disminución de los comportamientos sexual y agresivo (D'Aquila et al., 1994), también se ha visto una disminución de la actividad motriz y trastornos del sueño (Moreau et al., 1995; Gorka et al., 1996).

Se ha comprobado que en los modelos de CMS se da una disminución en la respuesta a estímulos placenteros, lo que es comparable a la anhedonia en humanos (incapacidad total o parcial para experimentar placer), síntoma central de la depresión mayor según la Asociación Psiquiátrica Americana (*American Psychiatric Association*, 1994).

El parecido con la depresión humana también se da a nivel fisiopatológico. Se ha observado que los animales sometidos a CMS presentan aumento de citoquinas proinflamatorias (Grippio et al., 2005); daño oxidativo (Lucca et al., 2009), muerte

neuronal en el hipocampo (Jayatissa et al., 2006), apoptosis (Kosten et al., 2008) y desregulación del ritmo circadiano del eje HPA (Christiansen et al., 2012).

3. Validez predictiva: Los cambios comportamentales que se dan en el CMS se revierten con un tratamiento con distintos tipos de antidepresivos (Antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de Noradrenalina, inhibidores de la Monoamino oxidasa A (IMAO-A) o agonistas de 5-HT_{1A}).

4. Se trata de un modelo adecuado para estudios sobre la neuroinflamación inducida por estrés (Farooq et al., 2012).

1.3.3. Grupos experimentales

Con el fin de estudiar el papel que tienen las bacterias intestinales en la neuroinflamación y los cambios comportamentales (*depression-like behaviour*) producidos por este modelo de estrés, dos de los grupos fueron sometidos a un protocolo de descontaminación intestinal.

Para llevar a cabo la descontaminación, se administró por vía oral, el tratamiento antibiótico desde el primer día y durante los 21 días que duró el experimento. Los antibióticos utilizados fueron estreptomicina sulfato (2mg/mL) y penicilina G 1,500U/mL (Sigma) diluidos en el agua para beber, de modo que el grupo control en este caso recibió agua. Este protocolo está descrito en otros estudios (Ando et al., 2000; Caso et al., 2009), demostrando una descontaminación que se limita al tracto gastro-intestinal sin que el antibiótico penetre en el organismo. Este cóctel de antibióticos administrado en el agua de bebida no tiene efectos neuroprotectores o antiinflamatorios en el SNC.

Los grupos experimentales que se utilizaron en este modelo fueron cuatro (número de animales por grupo n=8).

1. **CONTROL:** CONTROL
2. **CMS:** 21 días de CMS
3. **CONTROL+ATB:** CONTROL con antibiótico en la bebida 21 días
4. **CMS+ATB:** 21 días de CMS y de antibiótico en la bebida, simultáneamente.

2. TOMA DE MUESTRAS

En los tres modelos experimentales los animales recibieron una inyección intraperitoneal de anestesia terminal de pentobarbital sódico 320mg/kg (Vetoquinol®, Madrid, España) al final de la última sesión de estrés. Tras observar la ausencia de movimientos respiratorios y de reflejos al pinzamiento de la cola o de las patas traseras, se procedió a la toma de muestras.

2.1. EXTRACCIÓN DE TEJIDO FRESCO

1. PLASMA: En los protocolos en los que se extrajo sangre del animal vivo, ésta se obtuvo durante la inmovilización aguda en rata y se extrajo de la vena caudal. La sangre que se extrajo en el sacrificio se obtuvo por punción cardíaca tras proceder a la apertura de la cavidad torácica.

La sangre se mezcló inmediatamente con una disolución anticoagulante de citrato sódico (3,15% p/v) en una proporción 9:1. Para obtener la fracción plasmática la sangre se centrifugó a 1500g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recogió el plasma sobrenadante para guardarlo a -80°C hasta su uso.

2. GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS: Después de sacar la sangre, la piel abdominal se esterilizó con etanol al 70% (v/v) y se abrió la cavidad abdominal. Los ganglios linfáticos mesentéricos se extrajeron en condiciones estériles, se pesaron y homogenizaron en 2mL de solución salina estéril para estudiar la traslocación bacteriana intestinal a este órgano.

3. BAZO: De la cavidad abdominal ya abierta se extrajo en condiciones estériles un fragmento de bazo que se pesó y homogenizó en homegenizador vidro-teflón, en 2mL de solución salina estéril para estudiar la posible traslocación bacteriana intestinal a este órgano.

4. HÍGADO: De la cavidad abdominal ya abierta se extrajeron dos fragmentos del lóbulo izquierdo del hígado. Un fragmento se congeló inmediatamente en nieve carbónica para guardarlo a -80°C. El otro fragmento se pesó y homogenizó en 2mL de solución salina estéril para estudiar la posible traslocación bacteriana intestinal a este órgano.

5. COLON DESCENDENTE: Se extrajeron 2 cm distales de colon (región comprendida desde el recto al ángulo esplénico, aproximadamente). Después de limpiarlo de heces, se congeló en nieve carbónica, para guardarlo posteriormente a -80°C. Esta región se escogió porque, del tracto gastrointestinal, es la zona que presenta mayor cantidad de TLR-4 (Ortega-Cava et al., 2003).

6. TEJIDO CEREBRAL: Tras la extracción y limpieza del cerebro se aislaron fragmentos de corteza cerebral prefrontal, que fueron congelados inmediatamente en nieve carbónica y guardados a -80°C, salvo los fragmentos que fueron procesados para la extracción de los núcleos celulares.

Justificación de la elección de la corteza prefrontal: La corteza cerebral de rata y ratón presenta niveles elevados de mediadores proinflamatorios (como NF- κ B, iNOS o COX-2) y anti-inflamatorios (PPAR γ), y es susceptible de desarrollar procesos neuroinflamatorios inducidos por estrés (García Bueno et al., 2008). Por otra parte, esta región es importante para la regulación del eje HPA en la respuesta a estrés (Radley et al., 2006), y por último, señalar que se ha observado expresión de TLR-4 tras la exposición a diferentes estímulos inmunes/inflamatorios en neuronas corticales (Tang et al., 2008), astrocitos (Caso et al., 2007), microglía (Olson y Miller, 2004; Jou et al., 2006) y células endoteliales (Singh y Jiang, 2004; Nagyoszi et al., 2010).

2.2. EXTRACCIÓN DE TEJIDO FIJADO PARA ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

La extracción y preparación del tejido cerebral para inmunohistoquímica se realizó perfundiendo a los animales con paraformaldehído. Para realizar este protocolo los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico como se describe anteriormente. En un primer momento se los perfundió a través del ventrículo izquierdo con solución salina estéril (0,9%) como solución lavadora vascular. A continuación, se utilizó una solución fijadora compuesta por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,2M y pH 7,4. Se extrajeron los cerebros y se acabaron de fijar por inmersión en paraformaldehído durante tres horas a temperatura ambiente. Por último se introdujeron en una solución de KPBS 0,1M con sacarosa al 30% a 4°C durante 24 horas, de manera que el tejido queda crioprotegido y listo para su posterior procesamiento.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1. PROCESAMIENTO DE TEJIDO FRESCO

En el momento del sacrificio algunos tejidos fueron procesados sin congelarse, como los destinados a las pruebas microbiológicas y a la extracción de núcleos y citosoles.

3.1.1. Microbiología

Los tejidos que se utilizaron para comprobar la presencia de bacterias (ganglios mesentéricos, hígado y bazo) se procesaron de la siguiente manera: tras su extracción se introdujeron en 2mL de solución salina estéril donde se homogenizaron en homogenizador vidrio-teflón. Se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 de la suspensión; cada dilución fue sembrada en placas de Agar MacConkey y Agar sangre 5% para contabilizar bacterias aerobias, y en placas de Agar Brucella para contabilizar las bacterias anaerobias.

La incubación se realizó a 35-37°C, 24h para las especies aerobias y 48h para las anaerobias. Tras la incubación, las placas Petri[®] fueron examinadas, y se contaron las colonias; este dato se presenta en unidades formadoras de colonias por mg de tejido (UFC/mg). Se determinó con tinción de Gram, a qué tipo de bacterias pertenecían.

Por último, se realizaron diversas pruebas para determinar la especie a la que pertenecían las UFC obtenidas. Para los microorganismos aerobios, se emplearon los ensayos de la oxidasa (Mast Diagnostics[®]), discos antibióticos de optoquina, bacitracina y novobiocina (Mast[®]), coagulasa (Beckton Dickinson[®]), catalasa, y el sistema de identificación bioquímica BBL[™] Enterotubo II[™] (Difco Laboratories, Detroit, MI, EEUU). El sistema API 20 NE (Biomerieux[®]), se utilizó para los bacilos Gram – no fermentadores, y el API 20 Strep para enterococcus. Para los anaerobios, se empleó el sistema de identificación Rapid ID 32 A (Biomerieux[®]).

Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Gómez-Lus, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

3.1.2. Obtención de extracto nuclear y citosólico

La extracción se realizó según el método de Schreiber (1989) con algunas modificaciones: se aislaron las muestras de corteza cerebral e inmediatamente se homogenizó el tejido con una pipeta en 300µL de tampón HEPES 10mmol/L a pH 7,9, con cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), EDTA (1mM), EGTA (1mM), KCl (10mM), NaF (5mM), NaVO₄ (1mM), sacarosa (0.5M) y Na₂MoO₄ (10mM). Después de 15 minutos en hielo, se añadió el detergente Nonidet P-40 (Roche) a una concentración de 0,5%. Los tubos fueron cuidadosamente volteados durante 15 segundos y se obtuvieron los núcleos mediante centrifugación a 4000g durante 5 minutos. Se separaron los sobrenadantes que se volvieron a centrifugar 5 minutos a 13000g para aislar la fracción citosólica.

Los “pellets” nucleares restantes fueron resuspendidos en 100 µL de tampón suplementado con 20% glicerol y KCl 0.4M, que se agitaron lentamente durante 30 minutos a 4°C. Los extractos de proteína nuclear fueron obtenidos tras centrifugación a 13000g durante 5 minutos, alicuotados y conservados, al igual que los citosoles, a –80°C. Todos los pasos del proceso de fraccionamiento se llevaron a cabo a 4°C.

La pureza de los extractos se comprobó mediante Western blot (WB), usando anticuerpos de marcadores específicos de núcleo y de citosol. Para reconocer núcleo se eligió el factor de transcripción SP1, y para el citosol, la proteína inhibidora de NF-κB, IκBα (Figura 13).

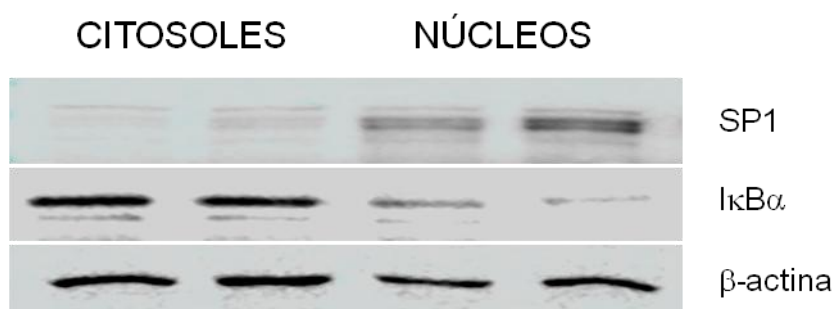


Figura 13. WB de las proteínas específicas de núcleo (SP1) y de citosol (IκBα), y de control de carga (β-actina).

3.2. TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOQUÍMICAS

3.2.1. Corticosterona plasmática

Los niveles de corticosterona plasmática se determinaron utilizando un kit comercial de radio-inmunoensayo para corticosterona marcada radiactivamente con el isótopo I^{125} (Coat-a-count[®] rat corticosterone kit, Siemens medical solutions diagnostics. Los Angeles, CA). La radiactividad resultante en las muestras se midió en un contador de centelleo gamma (Perkin Elmer) durante 1 minuto.

3.2.2. Cuantificación proteica

Las muestras que se utilizaron en Western blot fueron previamente cuantificadas para conocer su contenido proteico. Estas muestras son los fragmentos de colon, los extractos nucleares y citosólicos, así como muestras de corteza prefrontal. Estas últimas se obtenían homogenizando los trozos de corteza congelados por sonicación 15sg (Digital Sonifier, BRANSON) en 350µL de cóctel de homogenización compuesto por PBS pH=7, al que se añade una pastilla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). El homogenado se centrifugó a 12.000g, 20 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante a continuación, donde se cuantificó su contenido proteico. Se homogenizaron los fragmentos de colon con homogenizadores vidrio-teflón en 600µL de coctel de homogenización, y a continuación se sonicaron. Estos, por último, se centrifugaron 10 minutos a 4°C y a 12.000g para recuperar el sobrenadante.

El contenido proteico se determinó siguiendo el método Bradford[®] que se basa en la capacidad de las proteínas de unirse a determinados colorantes; el azul brillante g-250 coomassie se adhiere a la proteína, el colorante se torna de rojizo a azulado y el máximo de absorción cambia de 465 a 595nm. El valor de la absorbancia a 595nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. La absorbancia se determina con un lector de placas (Synergy 2, Bio Tek). El cálculo de la concentración proteica de las muestras se realiza preparando una curva patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (Sigma) (6 puntos entre 0 y 1mg/mL), y sus correspondientes densidades ópticas.

3.2.3. Western blot (WB)

Los homogenados de las distintas muestras, después de ajustar su contenido proteico, se mezclaron con Laemmli[®] (Biorad) y con β -mercaptoetanol al 5%, hasta doblar el volumen original. Se cargaron entre 10 y 20 μ g de muestra dependiendo de la proteína a determinar, en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida en un porcentaje variable según el peso molecular de la proteína estudiada (Tabla 2). La electroforesis se realizó a 100 voltios hasta la completa migración de las proteínas. Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Millipore[®]) por transferencia semi-seca a 24mA (Bio-Rad Trans-blot. SD, semi-dry transfer cell), durante 25-50 minutos en función del peso molecular (Tabla 2).

Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada o albúmina sérica bovina sólida, al 5% durante 90 minutos, a temperatura ambiente y fueron incubadas una noche a 4°C con los respectivos anticuerpos primarios. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween, se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos (Tabla 2).

Las bandas proteicas reconocidas por los anticuerpos se revelaron mediante un kit ECL[®] de quimioluminiscencia (Amersham) y visualizadas en el detector Odyssey[®] Fc. (LI-COR). Las bandas proteicas se cuantificaron mediante densitometría (programa Image J). Las exposiciones se hicieron a varios tiempos para asegurar la linealidad de la intensidad de las bandas.

Como control de carga se utilizaron las proteínas β -actina en citosoles y corteza total, y SP1 para proteínas nucleares.

Proteína (peso kDa)	Tipo de Muestra	Acrilamida	Tiempo de transferencia	Anticuerpo 1º (dilución)	Anticuerpo 2º (dilución)
TLR-4 (95 kDa)	Homogenado corteza	8 %	45 min	S. Cruz 1:500 en leche:TBS tween 2.5%	Anti-Goat Sigma (1:2000)
MD-2 (20 kDa)	Homogenado corteza	12 %	25 min	S. Cruz 1:500 leche:TBS-tween 2,5%	Anti-Rabbit S. Cruz (1:1000)
MyD88 (33 kDa)	Homogenado corteza	12 %	25 min	ABCAM 1:500 leche:TBS-tween 2,5%	Anti-Mouse S. Cruz (1:1000)
COX-2 (72 kDa)	Homogenado corteza	10 %	40 min	S.Cruz 1:1000 leche:TBS-tween 2,5%	Anti-Goat Sigma (1:10000)
iNOS (130 kDa)	Homogenado corteza	7 %	50 min	ABCAM (1:1000)	Anti-Rabbit S.Cruz (1:2000)
NF-κB (65 kDa)	Extracto nuclear	8 %	40 min	S.Cruz (1:1000)	Anti-Rabbit S.Cruz (1:2000)
IκBα (36 kDa)	Extracto citoplasma	10 %	30 min	S.Cruz (1:1000)	Anti-Rabbit S.Cruz (1:2000)
CCL28 (15 kDa)	Homogenado colon	10%	25 min	R&D Systems (1:1000)	Anti-Mouse S.Cruz (1:8000)
PPARγ (58 kDa)	Homogenado corteza	10 %	30 min	S.Cruz (1:1000)	Anti-Mouse Amersham (1:2000)
β-actina (42 kDa)	Homogenado corteza	7-10 %	En función de la proteína en estudio	Sigma (1:5000)	Anti-Mouse Amersham (1:3000)
SP1 (95/105 kDa)	Extracto Nuclear	8%	40min	S.Cruz (1:1000)	Anti-Rabbit S.Cruz (1:2000)

Tabla 2. Lista de anticuerpos y protocolos de las distintas proteínas estudiadas

3.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

- Extracción de RNA

Las muestras de corteza se homogenizaron con pipeta en 350µL de Trizol® (Invitrogen), en cada tubo se añadieron 100µL de cloroformo (Sigma), y tras agitarse

unos segundos se centrifugaron a 12000g 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase superior acuosa a la que se le añadió de nuevo Trizol[®] (200µL) y cloroformo (40µL), y se volvió a centrifugar para recuperar de nuevo la fase superior. A la fase acuosa esta vez se le añadieron 300µL de 2-propanol (Sigma) y se agitó en vortex. La mezcla se dejó reposando a 4°C dos horas. A continuación se centrifugó a 12000g, 10 minutos a 4°C de manera que se obtuvo un pellet de RNA. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el pellet con 500µL de etanol al 80% (la dilución se hace con Agua+Diethyl-pirocarbonato (Agua-DEPC), libre de DNAasas y RNAasas, Invitrogen). Por último, se dejó que se evaporase el exceso de etanol hasta que el pellet quedó seco y entonces, se resuspendió en 50µL de agua con DEPC y se guardó a -40°C. En todo momento se trabajó con guantes y material estéril.

- Retrotranscripción

Para la retrotranscripción, en primer lugar, se determinó la cantidad de RNA y su pureza utilizando el espectofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). A continuación se realizó la dilución con agua-DEPC necesaria para tener 1µg de RNA en un volumen final de 10µL. A esta dilución se le añadieron los siguientes reactivos: 5x RT buffer, Ditioneitol (DTT) 100mM, Deoxinucleótidos trifostato (dNTP) 25mM, Random primers, inhibidor de RNAasa y agua-DEPC.

La mezcla se sometió a 1min a 95°, 8min a 70°, 1min a 42°, utilizando un termociclador *My CyclerTM* (BIO-RAD). A continuación se volvió a añadir 5µL de Master mix, esta vez con Transcriptasa reversa (Invitrogen), y las muestras se pusieron una hora a 42°C para que tenga lugar la retrotranscripción de RNA a DNA.

Finalmente se añadieron 80µL de agua-DEPC y el DNA se guardó a -20°C.

- RT-PCR

Para medir la expresión de distintos genes se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés *real time PCR*), que es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y, simultáneamente, cuantificar el producto de la amplificación. La cuantificación es posible por la presencia de un fluoróforo que se une inespecíficamente al DNA, de manera que la emisión de fluorescencia aumenta a medida que se genera DNA. Dicha

medición se realiza al final de cada ciclo de amplificación, y por esto se le denomina PCR en tiempo real. En nuestro caso, la técnica es semi-cuantitativa, y relativa a los niveles de mRNA de tubulina. El fluorocromo utilizado en nuestro caso fue *SYBR Green* que excitado mediante luz azul ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$). El termociclador posee sensores que le permiten medir la fluorescencia (Corbett).

Se mezclaron 2 μL de la dilución de DNA con Master mix con *Taq* polimerasa comercial con *SYBRGreen* (Biotools, España) diluido en agua-DEPC (1:1) y sus respectivos cebadores, según el gen estudiado (Tabla 3).

Los ciclos a los que se sometieron las muestras en la PCR fueron:

3min a 95°
 10 seg. a 95°
 15 seg. a 60°
 20 seg. a 72°
 } 35 veces
 Melt: de 50 a 90°C

PROTEINA	CEBADOR DIRECTO (<i>forward</i>)	CEBADOR INVERSO (<i>reverse</i>)
RATA		
TLR-4	AGT TGG CTC TGC CAA GTC TCA GAT	TGG CAC TCA TCA GGA TGA CAC CAT
MD-2	CAT AGA ATT GCC GAA GCG CAA GGA	ACA CAT CTG TGA TGG CCC TTA GGA
MyD88	TCT GAG TGT GAA CAG CAG CAG ACT	TGA TGC CTC CCA GTT CCT TTG TCT
iNOS	GGA CCA CCT CTA TCA GGA A	CCT CAT GAT AAC GTT TCT GGC
COX-2	CTT CGG GAG CAC AAC AGA G	GCG GAT GCC AGT GAT AGA G
IL-1 β	ACC TGC TAG TGT GTG ATG TTC CCA	AGG TGG AGA GCT TTC AGC TCA CAT
NF- κ B p65	CAT GCG TTT CCG TTA CAA GTG CGA	TGG GTG CGT CTT AGT GGT ATC TGT
I κ B α	TGG CCT TCC TCA ACT TCC AGA ACA	TCA GGA TCA CAG CCA GCT TTC AGA
LBP	TGA CAT GTT ACC GCC TGA CTC CAA	AGA CCA CTG TTC CAA GAA GCT CCA
GAPDH	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
TUBULINA	CCC TCG CCA TGG TAA ATA CAT	ACT GGA TGG TAC GCT TGG TCT
RATÓN		
TLR-4	AAC CAG CTG TAT TCC CTC AGC ACT	ACT GCT TCT GTT CCT TGA CCC ACT
MD-2	CTC CGA TGC AAT TAT TTC CTA C	TGG CAC AGA ACT TCC TTA CG
MyD88	TAA GTT GTG TGT GTC CGA CCG TGA	ATC AGT CGC TTC TGT TGG ACA CCT
iNOS	CTG CTG GTG GTG ACA AGC ACA TTT	ATG TCA TGA GCA AAG GCG CAG AAC
COX-2	ACT GGG CCA TGG AGT GGA CTT AAA	AAC TGC AGG TTC TCA GGG ATG TGA
PPAR γ	ACA TAA AGT CCT TCC CGC TGA CCA	AAA TTC GGA TGG CCA CCT CTT TGC
IL6	TGG CTA AGG ACC AAG ACC ATC CAA	AAC GCA CTA GGT TTG CCG AGT AGA
GAPDH	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
TUBULINA	CCC TCG CCA TGG TAA ATA CAT	ACT GGA TGG TAC GCT TGG TCT
Tabla 3. Lista de los cebadores utilizados según el gen estudiado.		

3.2.5. Medidas de LBP y LPS plasmáticos

- Cuantificación de LPS plasmático

El lipopolisacárido (LPS), componente fundamental de la pared de las bacterias Gram -, se cuantificó en el plasma como índice de presencia de bacterias. Se utilizó el kit comercial *LAL Chromogenic endpoint assay* (Hycult Biotechnology b.v.) que es un ensayo del Lisado de Amebocitos del *Limulus* (LAL). La detección de endotoxina se basa en la producción de opacidad y gelación en el LAL en presencia de LPS por una reacción enzimática. Siguiendo las especificaciones del protocolo del kit, las cantidades de LPS (en unidades de endotoxina por mL) se determinaron por espectrometría a 405nm (*Synergy 2*, Bio Tek).

- Cuantificación de LBP plasmática

Se realizó la medida de la proteína de unión al LPS (LBP) en plasma, con el kit comercial *LBP for a wide variety of species ELISA test kit* (Hycult Biotechnology b.v.) en el caso de la rata, y para ratón se usó el *Mouse LBP ELISA kit* (Hycult Biotechnology b.v.). En ambos casos la concentración de LBP se determinó por espectrometría (*Synergy 2*, Bio Tek) a 450nm según el protocolo del kit. La sensibilidad de los kit es de 0,4ng/mL.

3.2.6. Actividad transcripcional de NF- κ B (subunidad p65)

La actividad de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B se determinó en los extractos nucleares previamente aislados. Se utilizó el kit comercial *NF- κ B (p65) Transcription Factor assay kit* (Cayman Chemical Company, MI, EEUU), que, con una técnica de ELISA, detecta la capacidad que tiene este factor de transcripción de unirse a secuencias consenso de DNA (Figura 14). La actividad se midió mediante espectrometría a 450nm (*Synergy 2*, Bio Tek) siguiendo las especificaciones del fabricante.

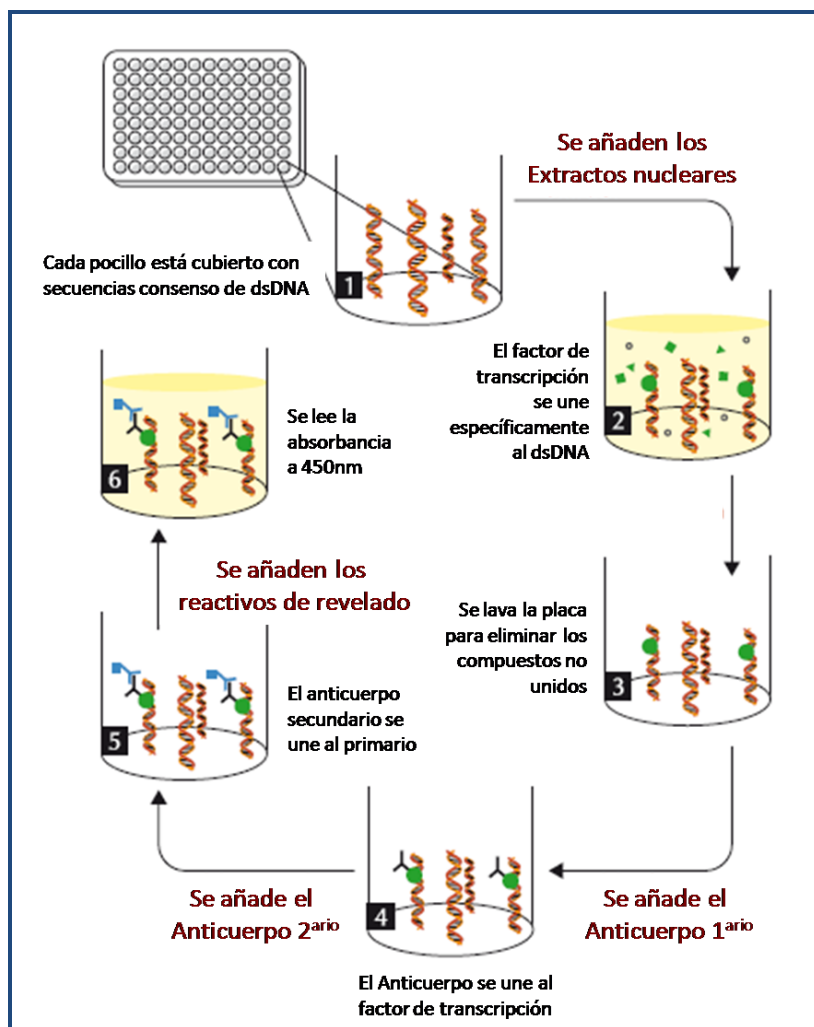


Figura 14. Esquema del funcionamiento del kit de la actividad transcripcional de NF- κ B p65 (extraído del protocolo del kit).

3.2.7. Medición de prostaglandinas en corteza prefrontal

- Preparación de las muestras

Las muestras de corteza cerebral fueron homogeneizadas por sonicación con pulsos de ultrasonidos (Labsonic 2000, Barcelona, España), en 400 μ L de tampón fosfato 0,1M, pH 7,4, EDTA 1mM e indometacina 10 μ M. Las muestras se purificaron añadiendo 1mL de etanol puro (Merk), agitándolas y dejándolas en frío 15 minutos. Se centrifugaron a 3000g 10 minutos y se recogió el sobrenadante de las muestras. Este sobrenadante se acidificó añadiendo 10 μ L de HCl 2M durante 15 minutos a 4°C. Después se realizó una centrifugación a 500g durante 2 minutos, se extrajo el sobrenadante y se almacenó en hielo hasta su posterior utilización.

Por otro lado se procedió a la activación y lavado de las minicolumnas de polipropileno de fase reversa (C18 Sep-Pak[®], Waters Corporation MA, EEUU), utilizadas para la purificación y extracción de las prostaglandinas presentes en los homogenados cerebrales. En primer lugar se introdujeron en la columna 3mL de metanol seguidos de 3mL de agua miliQ. A las columnas activadas y lavadas, se les añadió 1mL de muestra hasta que entró en el filtro completamente. Las columnas se volvieron a lavar con 3mL de agua destilada seguidos de 3mL de hexano puro (Sigma[®]), para aumentar la purificación de la muestra; ambos lavados se descartaron. Por último, las prostaglandinas presentes en la muestra se extrajeron con 1mL de acetato de etilo puro (Sigma[®]). Las prostaglandinas disueltas en acetato de etilo se almacenaron a -80°C hasta el día siguiente, en el que se evapora el disolvente bajo un flujo continuo de nitrógeno puro a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos. Una vez retirado el disolvente, las muestras se resuspendieron en 250µL de tampón comercial proporcionado por el kit.

- Cuantificación de 15d-PGJ₂ en corteza prefrontal

Se utilizó un kit comercial (15d-PGJ₂ EIA Kit, Assay Designs) (Forman et al., 1995) basado en el método inmuno-enzimático de adsorción (EIA) para la determinación de la prostaglandina 15d-PGJ₂.

La concentración de 15d-PGJ₂ presente en las muestras aisladas en las columnas se determinó por espectrofotometría (Synergy 2, Bio Tek) a 450nm, con corrección a 570nm y 590nm, según el protocolo del kit. La sensibilidad del ensayo es de 36pg/mL.

- Cuantificación de PGE₂ en corteza prefrontal

Los niveles cerebrales de PGE₂ fueron determinados mediante enzima-inmunoensayo EIA. Para la cuantificación de PGE₂, principal metabolito de las ciclooxigenasas e indicador más utilizado de su actividad en corteza cerebral (Abdel-Halim y Anggard, 1979), se utilizó un kit comercial (*PGE₂ enzyme immunoassay*, Amersham) (Bishai y Coceani, 1992). La concentración de PGE₂ se determinó por espectrofotometría (Synergy 2, Bio Tek) a 405nm, según las indicaciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo es de 15pg/mL.

3.2.8. Peroxidación lipídica en corteza prefrontal

La peroxidación lipídica es un proceso citotóxico que se determina a partir del test del ácido tiobarbitúrico para malonildialdehído, según el método descrito por (Das y Ratty, 1987) con algunas modificaciones. El malonildialdehído (MDA) es un producto tóxico resultante de la acción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno sobre las membranas celulares, proceso conocido como peroxidación lipídica. Las muestras de corteza cerebral se homogeneizaron por sonicación en 10 volúmenes de tampón fosfato (50mM). A continuación fueron desproteinizadas con ácido tricloroacético (TCA) al 40% y HCl 5M, y se añadió ácido tiobarbitúrico 2% p/v en NaOH 0.5N. Se agitó bien y se dejó reaccionar a 90°C. Se centrifugó posteriormente a 12.000g durante 15 minutos para separar la proteína. El cromógeno rosa generado se midió a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-7500. Se determina la cantidad de MDA por mg de proteína en cada muestra, extrapolando los valores de concentración de MDA de una curva patrón con concentraciones conocidas de sal de Tetrabutylamonio de malonildialdehído.

3.2.9. Medición de nitritos en corteza prefrontal

Las muestras de corteza cerebral se homogeneizaron por sonicación en 10 volúmenes de tampón fosfato (50mM); a continuación se centrifugaron 15 minutos a 13.000g a 4°C y se recogió el sobrenadante de cada una de ellas. En una placa de 96 pocillos se pone por duplicado 100µL de muestra o estándar con 50µL de N-1-(Naftil) etil-enediamina (Neda) 0,1% y 50µL de sulfanilamida 1%. Por último se leyó en el espectrofotómetro a 540nm (*Synergy 2*, Bio Tek). Se determina la cantidad de nitritos por mg de proteína en cada muestra, extrapolando los valores de concentración de nitritos de una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito de sodio.

3.2.10. Determinación de inmunoglobulina A en colon

Los homogenados de colón utilizados para WB, se utilizaron para cuantificar los niveles de inmunoglobulina A (IgA), empleando un kit comercial. Este kit, *Mouse IgA ELISA Quantitation Set*, mide por enzimoimmunoensayo los niveles de IgA (Bethyl Laboratories®, Montgomery, EEUU). Se determinaron los niveles por

espectrofotometría a una longitud de onda de 450nm (*Synergy 2*, Bio Tek), según el protocolo indicado en el kit. La sensibilidad del ensayo es de 15ng/mL.

3.3. INMUNOFLUORESCENCIA

Los cerebros de los animales perfundidos se cortaron con un microtomo de deslizamiento (Leica, SM2000). Los cortes de 30µm se guardaron en líquido anticongelante a -40°C hasta su utilización.

El marcaje de TLR-4 se realizó con el mismo anticuerpo utilizado en el WB (Santa Cruz). Para identificar los diferentes tipos celulares en los que se expresa el TLR-4, se realizó una doble inmunofluorescencia, basándonos en el protocolo de García-Bueno (2009).

En todos los casos, las secciones se incubaron en flotación, en una dilución del anticuerpo primario de TLR-4 1:50, en una solución de KPBS + TRITON[®] al 0,3% y al 5% de albúmina bovina o BSA, a 4°C, durante 48 horas en agitación. A esa dilución se añadieron, en cada caso, los anticuerpos primarios (Abcam) para detectar los marcadores de los tipos celulares cerebrales, es decir, NeuN para neuronas (1:200), la proteína de unión a calcio S100 (1:1000) para astrocitos, la molécula adaptadora de unión a calcio o IBA-1 (1:500) para microglía y la proteína de adhesión celular PECAM-1 (CD31) (1:200) para endotelio vascular.

Tras 48 horas de incubación, las secciones de cerebro se lavaron con KPBS y se incubaron las secciones con los respectivos anticuerpos secundarios *anti-goat* conjugado con Alexa 555 (1:200) y *anti-rabbit* conjugado con Alexa 488 (1: 200 a 1:500) para detectar los diferentes anticuerpos primarios celulares disueltos en KPBS + TRITON[®] AL 0,3%+BSA al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. Posteriormente las secciones se lavaron durante 30 minutos con KPBS, se montaron en portas Superfrost plus[®] (Thermoscientific), se dejaron secar durante 24 horas y se cubrieron con el líquido de montaje Prolong[®] Gold antifade reagent (Life Technologies[®]).

Se realizaron experimentos control sobre secciones procedentes de animales HeN control y estresados al incubarlas solo con cada uno de los anticuerpos primarios por separado y luego con ambos anticuerpos secundarios para comprobar que no existen reacciones cruzadas entre los anticuerpos primarios y secundarios ni entre los secundarios entre sí.

4. CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL

La prueba comportamental se llevó a cabo sólo con los animales del experimento de estrés crónico. Para medir el efecto del *Chronic Mild Stress* (CMS) se realizó el test de la natación forzada, comúnmente conocido como test de Porsolt. Este test consiste en forzar a los animales a nadar en un cilindro lleno de agua del que no pueden escapar, después de un cierto tiempo, los animales quedan inmóviles en lo que se interpreta como un estado de desesperanza ante la imposibilidad de escapar (Figura 15) (Porsolt et al., 1977).

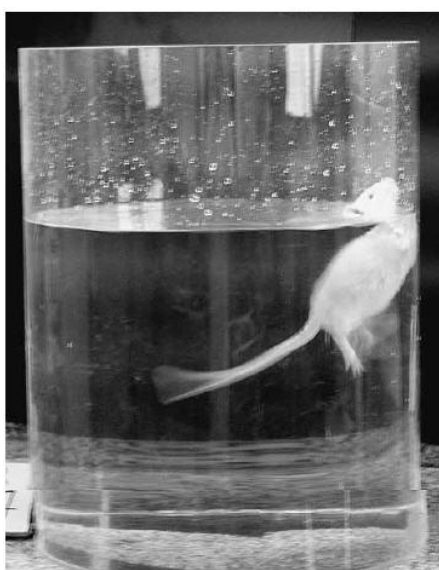


Figura 15. Imagen de un roedor realizando el test de la natación forzada.

El test se realizó en dos sesiones al final de los 21 días de CMS:

- *Pre-test:* cada animal se introdujo en un cilindro de 40cm de altura que contiene hasta los 30cm agua a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los animales se colocan en el cilindro y se registran mediante un sistema de DVD acoplado a una cámara todos los movimientos del animal (swimming, climbing o immobility) durante 15 min.
- *Test:* 24 horas después del pre-test todos los animales son sometidos al mismo protocolo, con la diferencia de que se registran durante 5 min.

Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Micó, en el Departamento de Farmacología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico realizado dependió en cada caso del número de grupos y de factores considerados.

En el caso de haber sólo dos grupos, se utilizó un análisis de *t de student* con un $p < 0.05$.

Cuando el ensayo se había realizado en más de dos grupos, se analizaron los datos con un Análisis de la Varianza o *ANOVA de una vía* con un $p < 0.05$, y en el caso de haber diferencias entre los grupos, se realizó un post test *Newman-Keuls* con un $p < 0.05$.

En el caso de los ratones genéticamente modificados se utilizó un Análisis de la varianza o *ANOVA de dos vías*, con un $p < 0.05$; siendo el primer factor la presencia o ausencia de estrés “estrés/no estrés” y el segundo el genotipo “C3H-HeN/C3H-HeJ”, el post-test de *Bonferroni* con un $p < 0.05$, se utilizó para determinar entre qué grupos se daban estas diferencias.

Este mismo análisis se utilizó además en el estudio de la evolución temporal de la corticosterona plasmática del estudio farmacológico, siendo un primer factor “el tiempo” y el segundo factor “el tratamiento”.

III. RESULTADOS

1. ACUTE RESTRAINT-STRESS IN RAT
2. SUBCHRONIC RESTRAINT-STRESS IN MICE
3. CHRONIC MILD STRESS IN RATS

1. ACUTE RESTRAINT-STRESS IN RAT

1.1 ROLE OF THE TLR-4 PATHWAY IN THE TIME COURSE OF THE STRESS RESPONSE

First, we determined the expression of different inflammatory parameters related to the activation of the TLR-4 pathway after 2h, 6h, and 6 h/day during 4 days of restraint-stress exposure.

1.1.1. Pro-inflammatory parameters in prefrontal cortex

The restraint-stress model used here has already shown to cause an up-regulation of different oxidative/nitrosative enzymes (iNOS and COX-2) after the activation and translocation to the nucleus of the transcription factor NF- κ B (Madrigal et al., 2001a; Madrigal et al., 2003c)

We studied the time course of pro-inflammatory parameters expression in the prefrontal cortex from rats subjected to 2h, 6h or 6h/day during 4 days of restraint-stress.

We performed Western blots (WB) of NF- κ B p65 subunit in nuclear extracts and of its inhibitory protein I κ B α in cytosolic extracts, and of iNOS and COX-2 in homogenates from prefrontal cortex. The expression of NF- κ B, iNOS and COX-2 increased after 6 hours of stress exposure, and iNOS and COX-2 remain increased after 4 days of repeated stress (Figure 16A-16D).

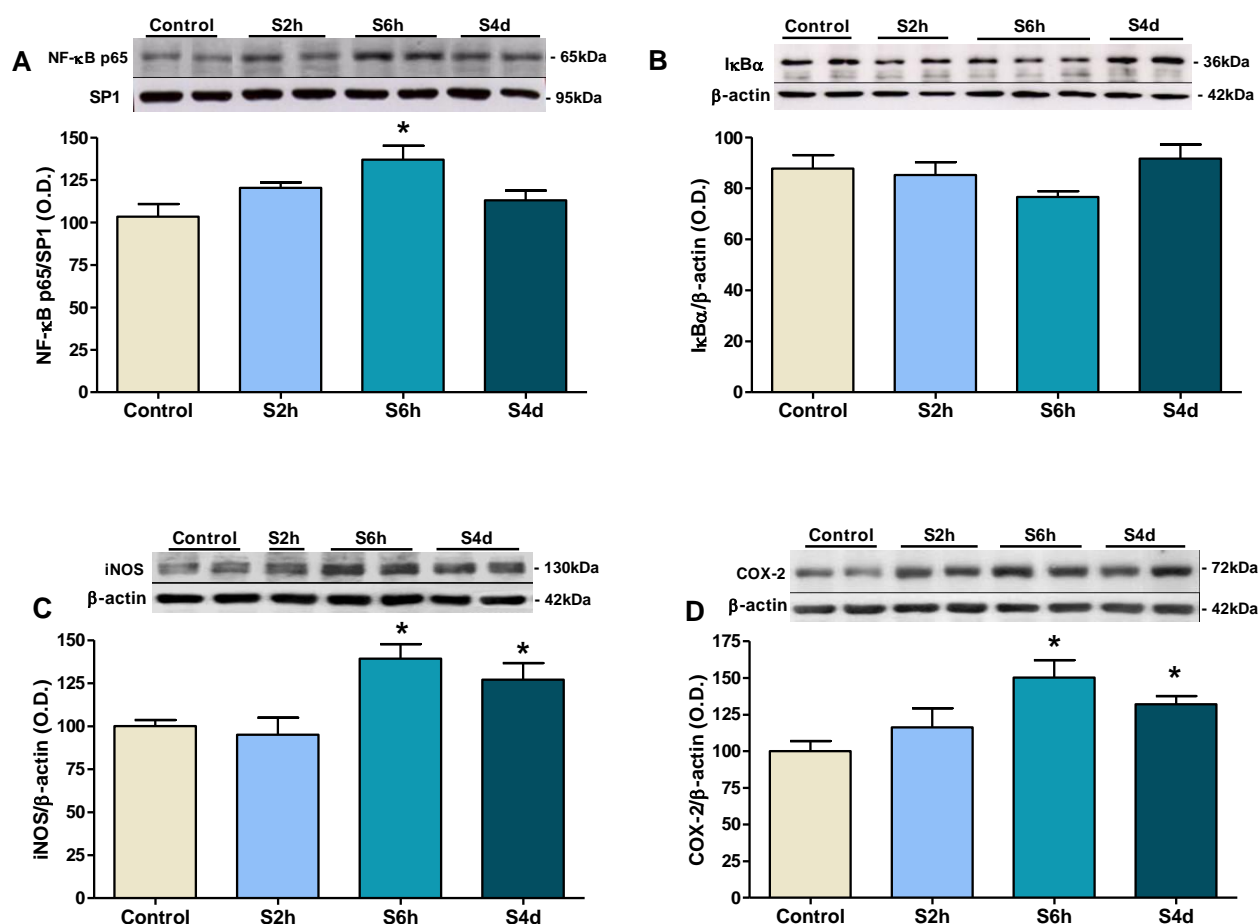


Figure 16. Stress-induced neuroinflammatory mediators.

WB of NF-κB p65 (A), IκBα (B), iNOS (C) and COX-2 (D); proteins and densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples, and in the nuclear and cytosolic extracts of control and Stress 2h, Stress 6h and Stress 6h/day during 4 days. The densitometric data are normalized by β-actin or SP1 for nucleus (lower bands) and are representative of 2 experiments. Data are mean ± SEM of 6 rats per group. * $p < 0.05$ vs. Control; One-way Analysis of variance following Newman-keuls *post-hoc* test. O.D.: optical density.

1.1.2. TLR-4 pathway parameters in plasma and prefrontal cortex

To verify if TLR-4 could be implicated in the neuroinflammation induced by the acute stress model, we measured plasma lipopolysaccharide binding protein (LBP) and TLR-4 expression in the prefrontal cortex (Figure 17A&B). Interestingly, after 2 hours of stress exposure, LBP appear increased, but its maximum is achieved after 6 hours of stress. At this moment, TLR-4 expression is also up-regulated in prefrontal cortex.

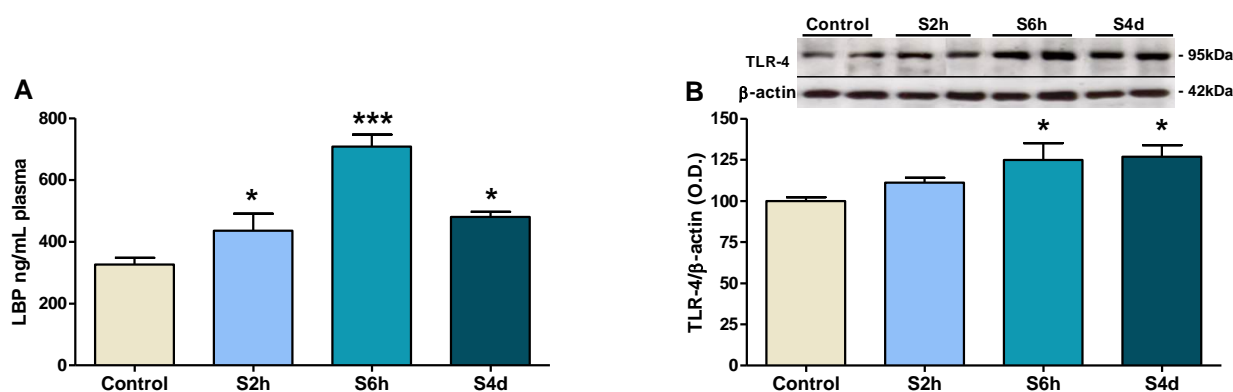


Figure 17. Stress-induced plasmatic LBP and TLR-4 up-regulation in prefrontal cortex.

Plasma LBP (A) and WB of TLR-4 (B) protein and densitometric analysis of the bands in brain prefrontal cortex samples of Control and Stress 2 hours, Stress 6 hours and Stress 6 hours a day during 4 days. The densitometric data are normalized by β -actin (lower band) and are representative of 2 experiments. Data are the mean \pm SEM of 6 rats per group. * $p < 0.05$ vs. Control; One-way ANOVA following Newman-keuls *post-hoc* test. O.D.: optical density.

All the inflammatory parameters studied increased after 6 hours of restraint-stress exposure including TLR-4.

In order to clarify the direct implication of TLR-4 pathway in the stress-induced neuroinflammation, we administrated the TLR-4 inhibitor TAK-242 and then submitted the animals to 6 hours of restraint-stress.

1.2. THE ROLE OF TLR-4 PATHWAY IN HPA ACTIVATION

1.2.1. Plasma corticosterone levels after 6 hours of stress exposure

Corticosterone is a useful marker to evaluate HPA axis activation. We studied corticosterone plasma levels after 6 hours of restraint stress. Stressed animals treated with the TLR-4 inhibitor did not show any difference with its control group at this time-point (Figure 18). Similarly, TAK-242 did not change corticosterone basal levels in rats.

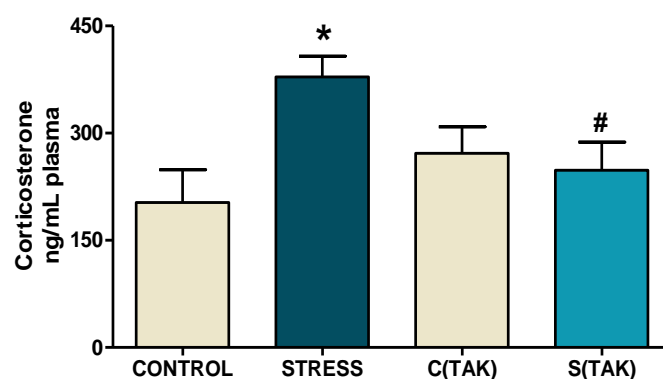


Figure 18. HPA axis activity was impaired in rats receiving TAK-242 after stress exposure.

Plasmatic corticosterone in Control rats and after 6 hours of stress, with and without TLR-4 inhibitor. Data are mean \pm SEM of 6-8 rats per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL; # $p < 0.05$ vs. STRESS; One-way ANOVA following Newman-keuls *post-hoc* test.

1.2.2. Time course of plasma corticosterone during the 6 hours of restraint stress

The difference observed between the two stressed groups could indicate that animals treated with TAK-242 are unable to mount a proper stress response. To verify the possibility of differences in the time course of response, we measured corticosterone plasma levels after 1h, 4h and 6h of stress in both groups (Figure 19). Corticosterone levels increased after 1h of stress in both groups, but 6h later the saline group maintained high levels of corticosterone, while, the group treated with the TLR-4 inhibitor returned to basal levels.

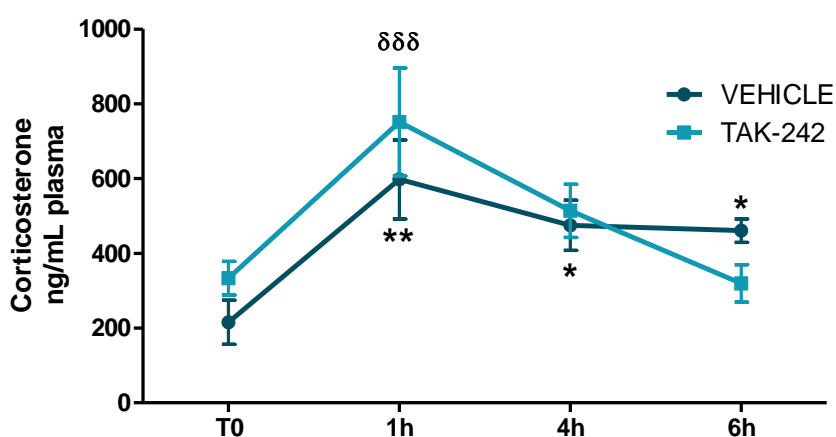


Figure 19. Plasma corticosterone levels: time course study.

Plasma corticosterone levels during stress in rats treated with TLR-4 inhibitor or with vehicle. Data are mean \pm SEM of 6-8 rats per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. T0+vehicle; $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ vs. T0+TLR-4(-). Two-ways ANOVA (factor one, "time"; factor two "treatment") following Bonferroni *post-hoc* test.

1.3. ROLE OF TLR-4 PATHWAY IN THE NEUROINFLAMMATION PRODUCED BY STRESS EXPOSURE IN RAT PREFRONTAL CORTEX

To elucidate the possible role of TLR-4 pathway in stress-induced accumulation of inflammatory mediators, we compared the activation of NF- κ B and the expression of its inhibitory protein I κ B α in the prefrontal cortex of control rats and after stress exposure in animals injected with vehicle or with TAK-242 (Figure 20A&B). After 6 hours of stress, the pro-inflammatory subunit p65 of the nuclear factor NF- κ B activity decreased, but this decrease is significant only in animals treated with TAK-242. That unexpected data in the stress untreated rats can be due to the mRNA increased levels of its inhibitory protein I κ B α observed.

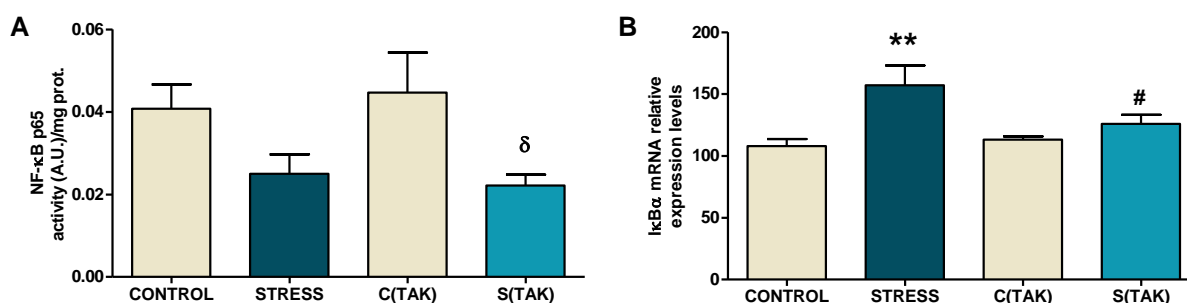


Figure 20. Inhibition of TLR-4 decreased NF- κ B activity and prevented stress induced I κ B α increase in rats prefrontal cortex after stress.

Activity of NF- κ B p65 subunit (A) in brain prefrontal cortex nuclear extracts samples and I κ B α (B) mRNA relative levels in brain prefrontal cortex of control and stressed rats with or without inhibition of TLR-4. Data are mean \pm SEM of 6-8 rats per group. * p <0.05, ** p <0.01 vs. CONTROL; # p <0.05 vs. STRESS; δ p <0.05 vs. C(TAK). One-way ANOVA following Newman-keuls *post hoc* test. A.U. arbitrary units.

We also studied the NF- κ B derived proinflammatory enzymes iNOS and COX-2, and the proinflammatory cytokine IL-1 β . TLR-4 inhibition with TAK-242 prevented the increase of these mediators after 6 hours of restrain stress (Figure 21A-C).

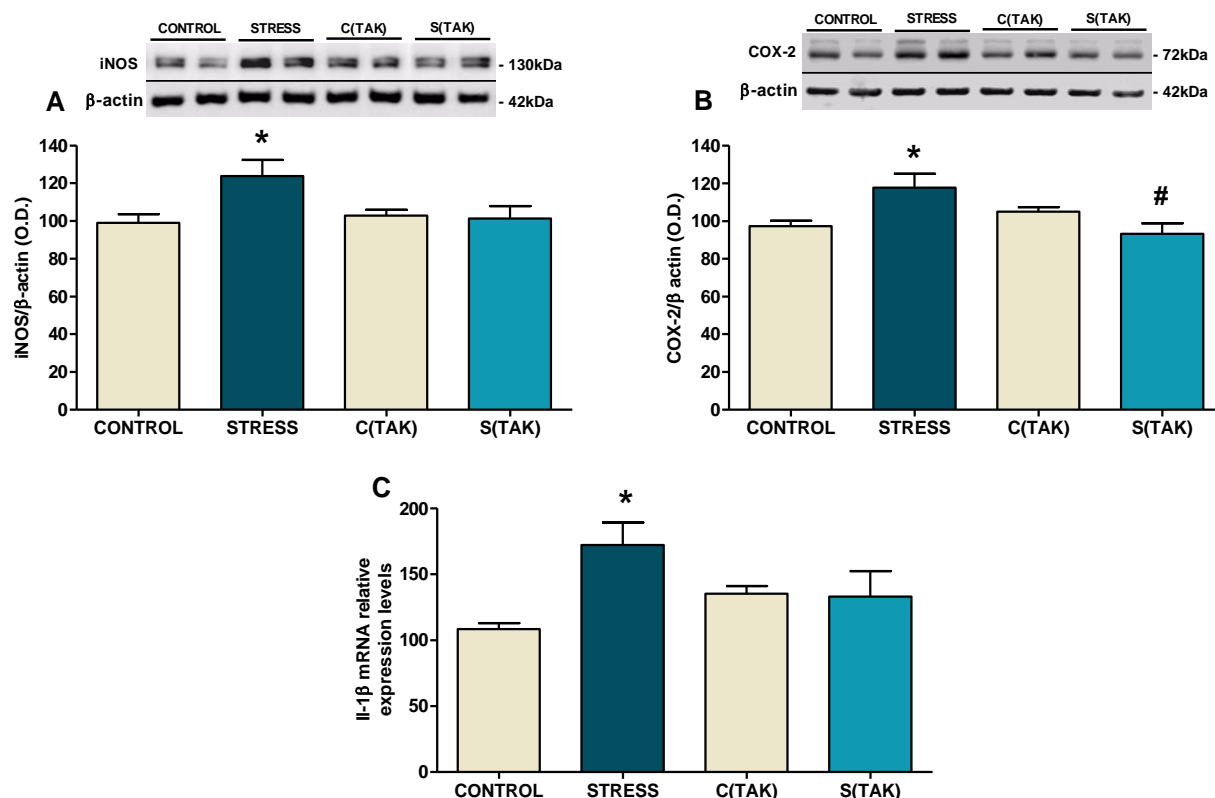


Figure 21. Inhibition of TLR-4 prevented stress-induced COX-2, iNOS and IL-1β increase in rat prefrontal cortex.

WB of iNOS (A); COX-2 (B) proteins and densitometric analysis of the respective bands, and IL-1β (C) mRNA relative levels in brain prefrontal cortex of control and stressed rats with or without inhibition of TLR-4. The densitometric data is normalized by β-actin (lower bands), and is representative of 2 experiments. mRNA is normalized with tubulin. Data are mean ± SEM of 6-8 rats per group *p<0.05 vs. CONTROL; # p<0.05 vs. STRESS; One-way ANOVA following Newman-keuls *post hoc* test. O.D.: optical density.

Finally, to verify the possible role of TLR-4 pathway on the oxidative/nitrosative damage after stress, we measured the accumulation of the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) in the brain prefrontal cortex. Restrain stress induced an increase of MDA, and this was prevented by pharmacological TLR-4 inhibition (Figure 22).

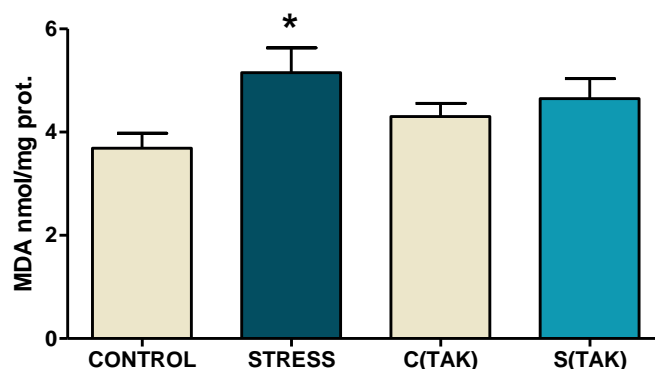


Figure 22. TLR-4 inhibition prevented stress-induced lipid peroxidation in brain.

Levels of malondialdehyde (MDA; a marker of oxidative stress) in the brain cortex in control rats and after stress exposure, with vehicle or TAK-242 treatment. Data are mean \pm SEM of 6-8 rats per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL; One-way ANOVA following Newman-keuls *post hoc* test.

1.4. EFFECTS OF TAK-242 IN TLR-4 UP-REGULATION AND SIGNALLING AFTER STRESS EXPOSURE

To verify if there is an activation of the TLR-4 signalling pathway in the acute stress model, we studied in rat brain prefrontal cortex, the expression of TLR-4 (at mRNA and protein level), its correceptor, myeloid differentiation factor-2 (MD-2), and the myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88), the most important adapter protein in the signal transduction pathway mediated by Toll-like receptors.

Stress exposure increased TLR-4 protein and mRNA levels in the prefrontal cortex in rat (Figure 23A&B). However, the proteins MD-2 and MyD88, and their mRNAs expressions were not modified after stress (Figure 23C-F).

Stress exposure in rats treated with TLR-4 inhibitor did not modify TLR-4, MD-2 or MyD88 expression when compared with control condition (Figure 23A-F).

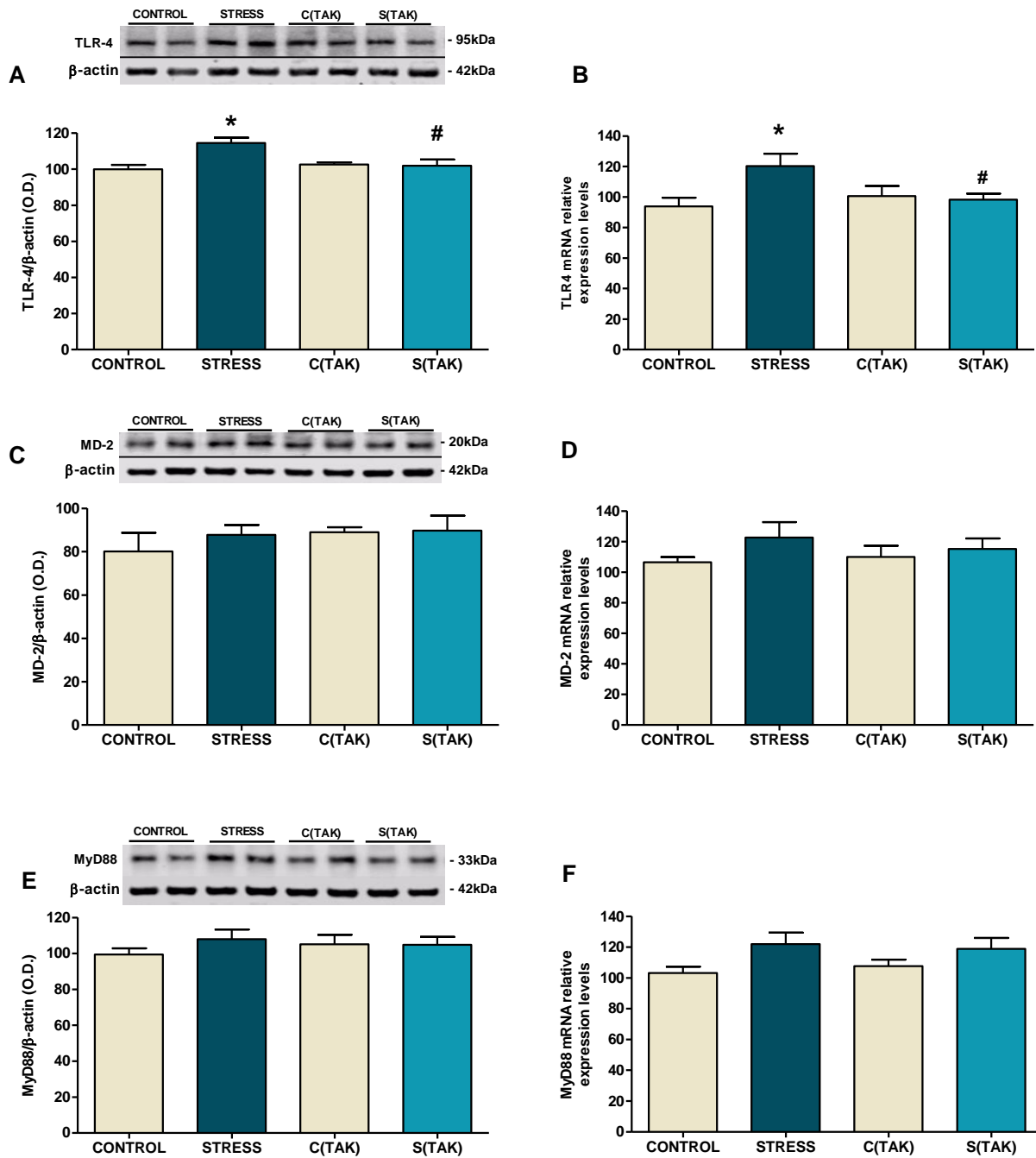


Figure 23. TLR-4 up-regulation was elicited by stress exposure in rat prefrontal cortex.

WB and PCR detection of TLR-4 (A-B), MD-2 (C-D) and MyD88 (E-F) proteins and mRNA relative levels. Densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples of control and stressed rats with vehicle or TAK-242 treatment. The densitometric data is normalized by β -actin (lower band) and the mRNA is normalized by tubulin. Data are mean \pm SEM of 6-8 rats per group. * $p < 0.05$; vs. CONTROL # $p < 0.05$ vs. STRESS; One-way ANOVA following Newman-keuls *post hoc* test. O.D.: optical density.

1.5. POSSIBLE ORIGIN OF TLR-4 ACTIVATION IN BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER STRESS

Since bacterial translocation has previously been described in this model of acute stress in rats, we studied the possibility of TLR-4 inhibition affecting this translocation at intestinal level. We analysed the presence of bacterial colonies in the mesenteric lymph nodes and the mRNA of the lipopolysaccharide binding protein (LBP) in the liver (Figure 24A&B). Both stressed groups of animals showed a similar number of bacterial colonies in their Mesenteric lymph nodes (MLNs) and an increase of hepatic LBP mRNA. The qualitative analysis identified the Gram + bacterial strains coagulase-negative *Staphylococcus*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. and *Micrococcus* sp. and the Gram – *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* after stress exposure in both groups of stressed rats. All these bacterial strains are part of the resident intestinal microbiota of wistar rats.

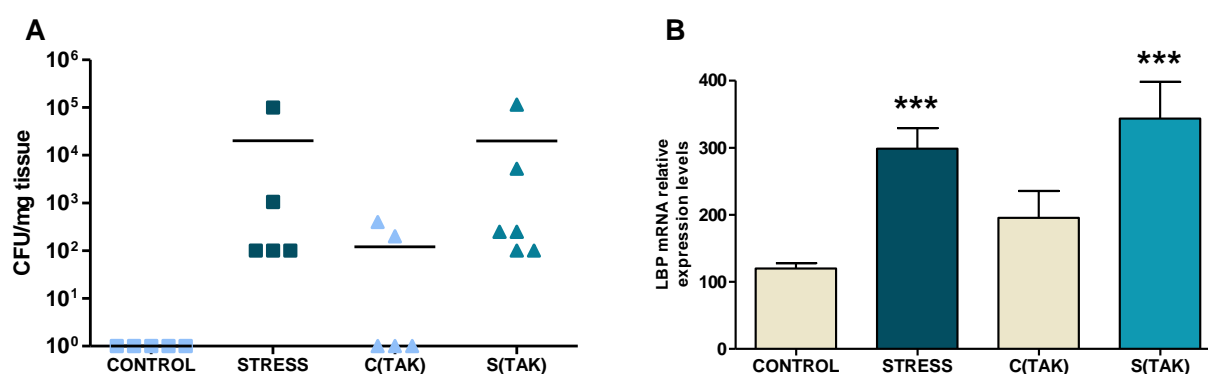


Figure 24. Bacterial translocation to MLNs and increase in hepatic LBP in stressed animals.

Bacteria colony-forming units (CFUs) per mg of tissue detected in mesenteric lymph nodes (A), and LBP (B) mRNA relative levels in control and stressed rats with and without TLR-4 inhibition. mRNA is normalized with tubulin. Data are the CFU found in each animal (A), and mean \pm SEM of 6-8 rats per group for LBP (B). *** $p < 0.001$ vs. CONTROL; One-way ANOVA following Newman-keuls *post hoc* test.

2. SUBCHRONIC RESTRAINT-STRESS IN MICE

2.1. OXIDATIVE/NITROSATIVE ENZYMES IN PREFRONTAL CORTEX AFTER LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION

To verify whether systemic LPS up-regulates the inflammatory mediators iNOS and COX-2 in the prefrontal cortex of rats via TLR-4 activation, HeN (normal TLR-4) and HeJ (non-functional TLR-4) mice received 0,1mg/kg of LPS. Two hours later both parameters were significantly increased in HeN, but not in HeJ mice (Figure 25 A&B).

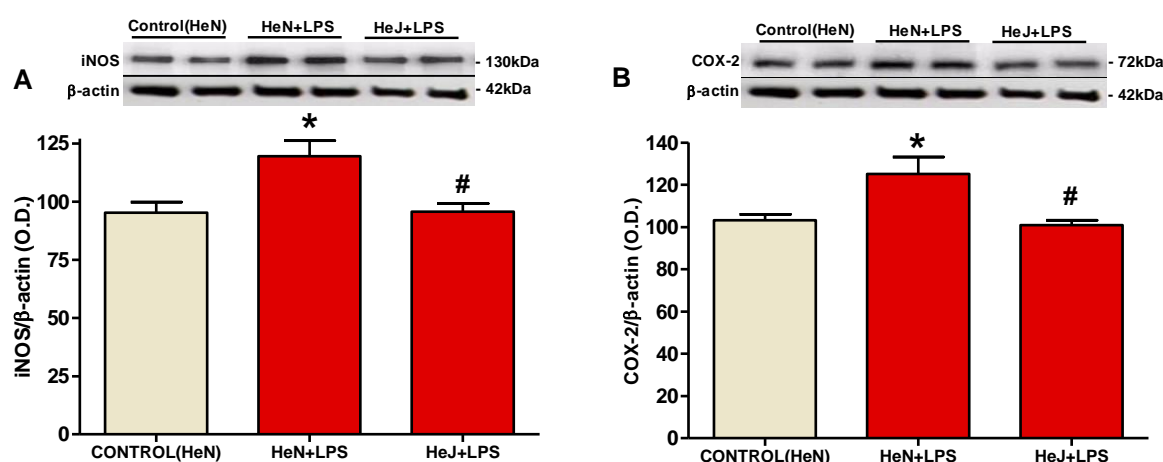


Figure 25. iNOS and COX-2 up-regulation elicited by LPS in HeN mice prefrontal cortex.

WB of iNOS (A) and COX-2 (B) proteins and densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples of Control C3H/HeN and LPS (0,1mg/kg i.p.) HeN and HeJ mice. The densitometric data is normalized by β-actin (lower band) and is representative of 3 experiments. Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN); # $p < 0.05$; vs. HeN+LPS. Two-ways Analyse of variance (ANOVA) following Bonferroni *post hoc* test. O.D.: optical density.

2.2. TLR-4 EXPRESSION AND SIGNALLING IN PREFRONTAL CORTEX AFTER STRESS IN HeN AND HeJ MICE

To evaluate if the TLR-4 pathway is activated in mice brain prefrontal cortex after stress exposure, we studied the expression of TLR-4, its correceptor myeloid differentiation factor-2 (MD-2), and the myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88), the most important adapter protein in the signal transduction pathway mediated by Toll-like receptors.

Stress exposure increased both TLR-4 and MD-2 at protein and mRNA level in the prefrontal cortex of HeN mice (Figure 26A-D). However, MyD88 expression

remained unaffected after stress exposure in HeN mice (Figure 26E&F). As expected, stress exposure in HeJ mice did not modify TLR-4, MD-2 or MyD88 expression when compared with control status (Figure 26A-F).

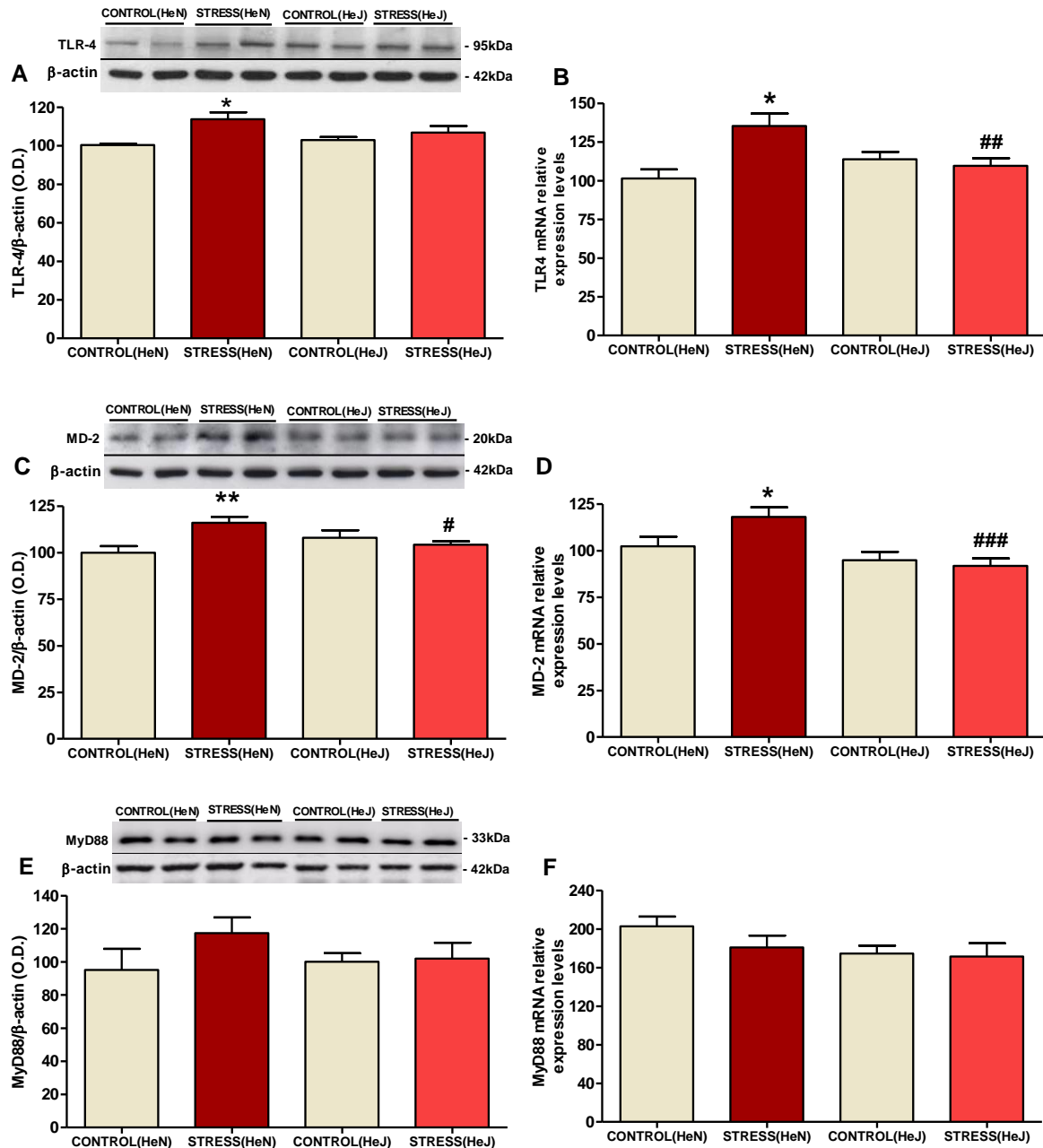


Figure 26. TLR-4/MD-2 up-regulation was elicited by stress exposure in HeN mice prefrontal cortex.

Protein and mRNA respective levels of TLR-4 (A-B), MD-2 (C-D) and MyD88 (E-F). Densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples of control and stressed C3H/HeN and C3H/HeJ mice. The densitometric data are normalized by β -actin (lower band) and the mRNA is normalized by tubulin. Data are representative of 3 experiments. Data are mean \pm SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. CONTROL(HeN) # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. STRESS(HeN). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test. O.D.: optical density.

2.3. CELLULAR TYPES DISPLAYING TLR-4 IMMUNOREACTIVITY IN THE PREFRONTAL CONTEX OF HeN MICE

Once TLR-4 protein expression and synthesis was quantified in the prefrontal cortex of HeN and HeJ mice after stress, we proceed to identify the cellular types where TLR-4 is expressed in this particular area of the brain. We made double immunofluorescence to colocalize TLR-4 with different cellular markers for neurons (NeuN), microglia (IBA1), astroglia (S100) and vascular endothelium (PECAM-1). A detailed examination of the images indicates that TLR-4 is highly expressed in neurons (Figure 27), astroglia (Figure 28) and microglia (Figure 29). On the contrary, the endothelial immunoreactivity is slight (Figure 30). In addition, no apparent differences in expression or cellular distribution for TLR-4 were found between control and stress conditions in HeN mice.

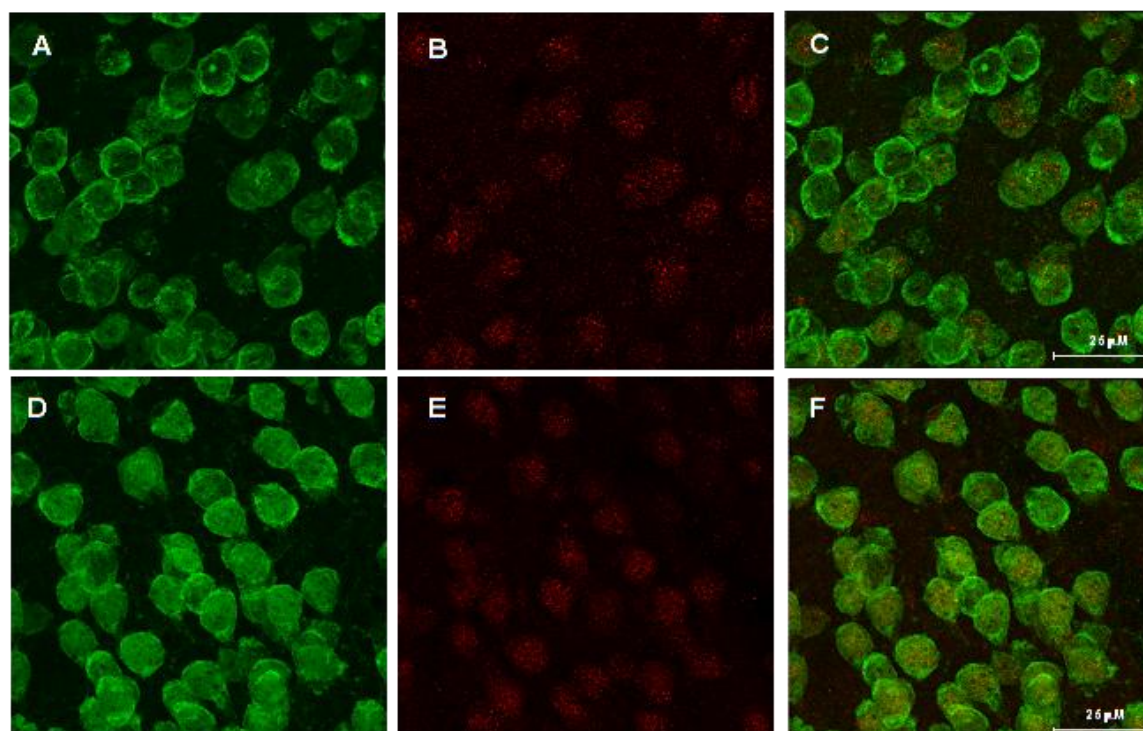


Figure 27. TLR-4 expression in neurons.

30μm sections through the prefrontal cortex of HeN mice, in control (top row) and stress (bottom row) conditions. Neurons are identified with NeuN in green (A&D); TLR-4 is marked in red (B&E), the receptor localizes to neurons, with areas of overlap appearing in the merged images (C&F).

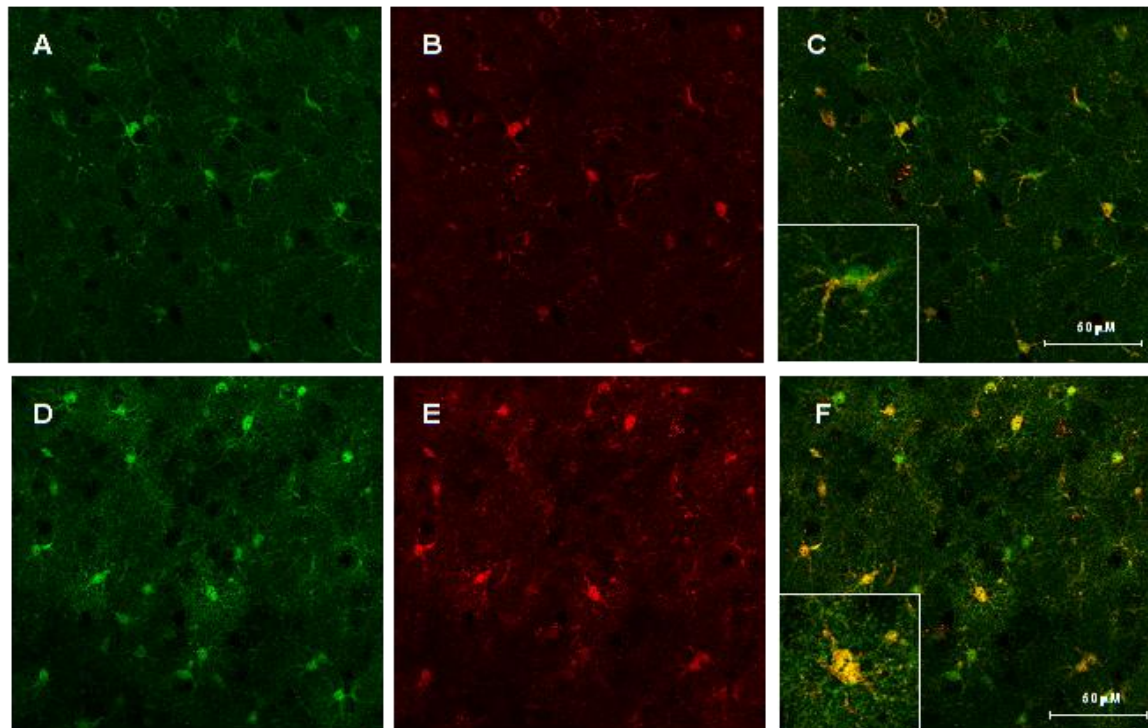


Figure 28. TLR-4 expression in astroglia.

30μm sections through the prefrontal cortex of HeN mice, in control (top row) and stress (bottom row) conditions. Astroglia is identified with S100 in green (A&D); TLR-4 is marked in red (B&E), the receptor localizes to astrocytes, with areas of overlap appearing yellow in the merged images (C&F).

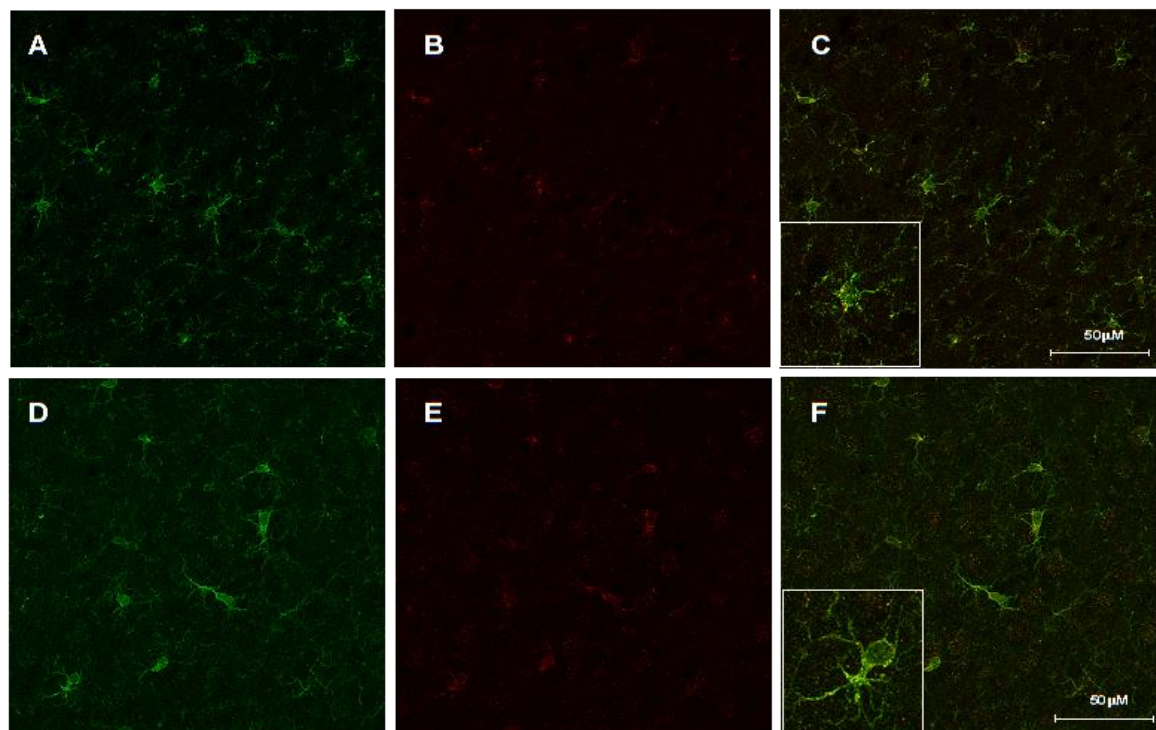


Figure 29. TLR-4 expression in microglia.

30μm sections through the prefrontal cortex of HeN mice, in control (top row) and stress (bottom row) conditions. Microglia is identified with Iba1 in green (A&D); TLR-4 is marked in red (B&E), TLR-4 localizes with microglia in areas of overlap appearing yellow in the merged images (C&F).

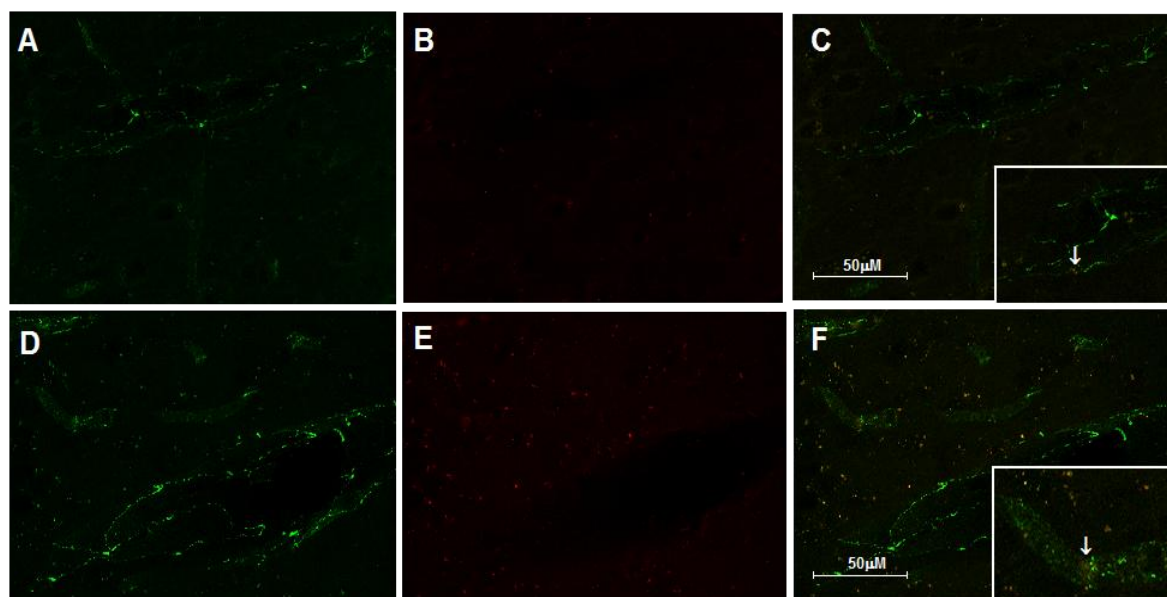


Figure 30. TLR-4 expression in endothelium.

30μm sections through the prefrontal cortex of HeN mice, in control (top row) and stress (bottom row) conditions. Endothelium cells are identified with PECAM-1 in green (A&D); TLR-4 is marked in red (B&E), the receptor localizes to endothelium, with areas of overlap appearing in the merged images, indicated with an arrow in an amplified image (C&F).

2.4. POSSIBLE REGULATORY MECHANISMS OF TLR-4 ACTIVATION IN BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER STRESS

Lipopolysaccharide (LPS) is the main ligand of TLR-4, whose activation switches on intracellular inflammatory pathways. In order to clarify the origin of the stress-induced activation of the TLR-4 pathway, we studied LPS and LPS binding protein (LBP) levels in plasma, as well as bacterial translocation in mesenteric lymph nodes (MLNs), liver and spleen. Stress exposure produced an increase of LBP in plasma and significant differences were found between both stressed mice strains (Figure 31). Neither plasmatic LPS, nor bacterial translocation showed differences after 4 days of stress exposure in both strains of mice when compared to their respective controls and between them (data not show).

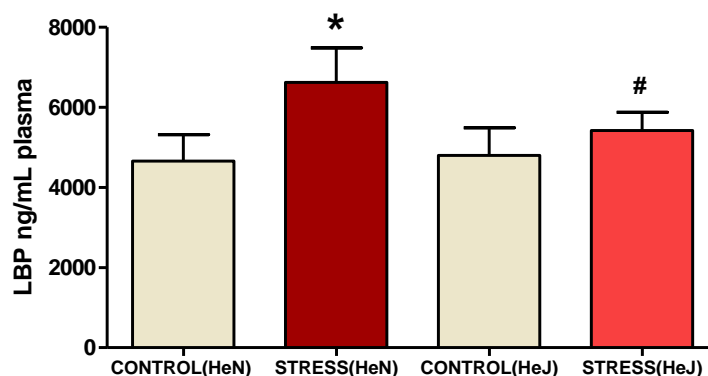


Figure 31. Plasma LBP increased in HeN mice after stress exposure.

LPS binding protein (LBP) plasma levels of control and stressed HeN and HeJ mice. Data are mean \pm SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN); # $p < 0.05$ vs. STRESS(HeN).. Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test.

Since there is a marked intestinal inflammation and an increase in bacterial translocation in acute stress protocols (Ponferrada et al., 2007) and taking into account that LBP and TLR-4 were increased after 4 days of stress exposure, we decided to study the possibility that the bacterial translocation and intestinal dysfunction took place before the fourth day of stress. To verify this possibility a group of animals was exposed to two days of stress.

In this case, we also found that LPS does not change after stress exposure in HeN mice, although a trend to increase exists, but HeJ mice showed increased levels in control and stress conditions (Figure 32A).

A further analysis of viable microorganisms was conducted in mesenteric lymph nodes (MLNs), spleen, liver and blood. After two days of stress, bacteria were found in MLNs of one control and all of the stressed HeJ mice, and in spleen and liver of both groups of stressed animals (Figure 32B-D). However, there were no bacteria in the blood of any group of mice (Figure 32E). The qualitative analysis identified the Gram + bacterial strains *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, *Bacillus* sp. and *Lactobacillus* sp. after stress exposure in HeN mice while in HeJ mice the strains of traslocated bacteria were *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. *Streptomyces* sp. and the Gram – *Proteus mirabilis*. All these bacterial strains are part of the resident intestinal microbiota of C3H mice.

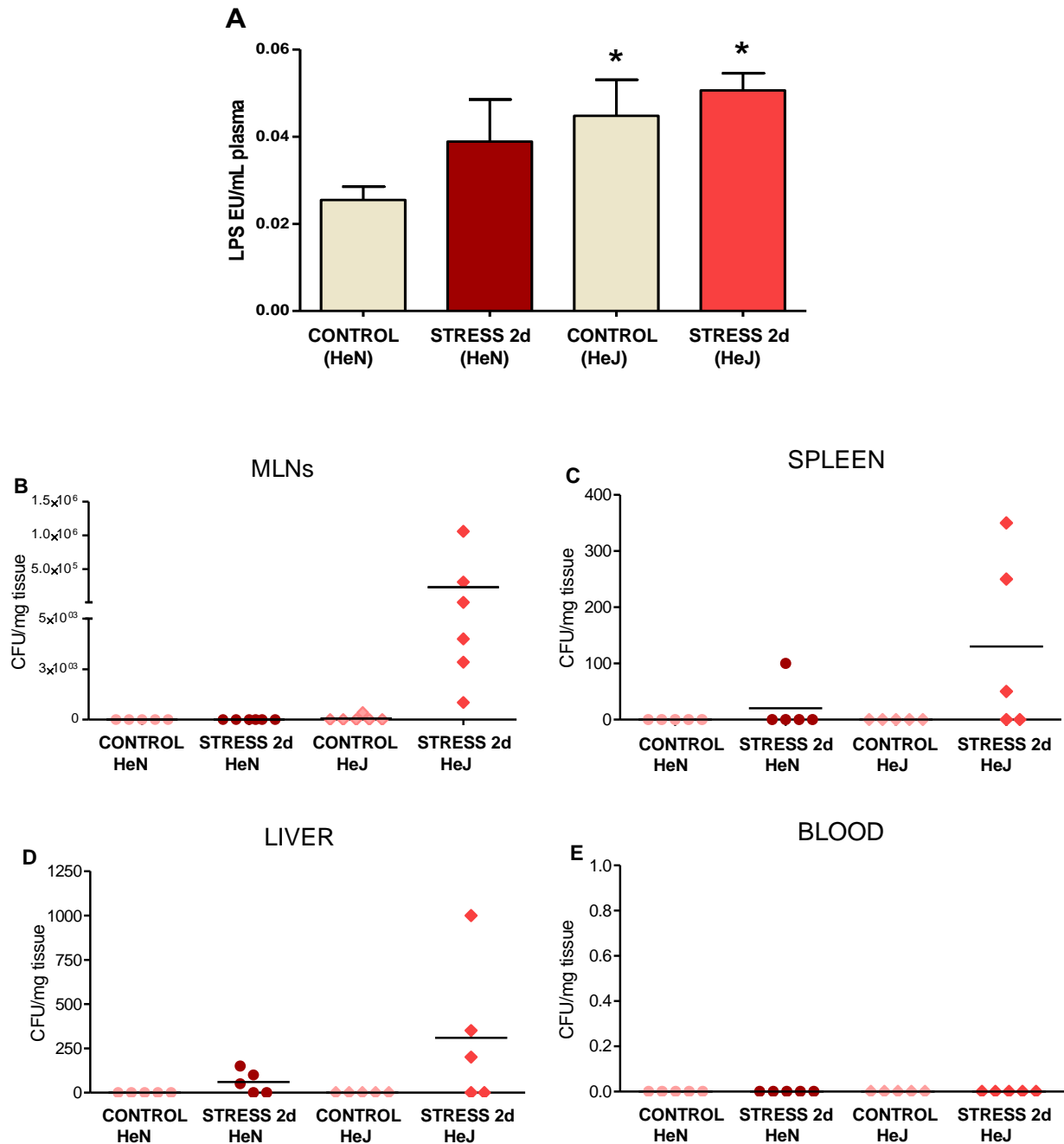


Figure 32. Increased plasmatic LPS and bacterial translocation to MLNs, spleen and liver, in stressed mice. LPS plasma levels of control and stressed HeN and HeJ mice (A). Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test. Bacteria colony-forming units (CFUs) per mg of tissue detected in mesenteric lymph nodes (B), spleen (C), liver (D) and blood (E) in control and stressed HeN and HeJ mice. The data represents the CFU found in each animal.

To clarify if the bacterial translocation observed after stress is related to intestinal inflammation, we decided to study some parameters related to inflammation in this organ. We quantified the chemokine CCL28, also known as mucosae-associated

epithelial chemokine, which regulates the migration of Immunoglobulin-expressing cells. Secretory IgA represents a first line defence mechanism against pathogens and a decrease in its amount in the colonic lumen could contribute to bacterial translocation. CCL28 levels are increased after two days of stress in the colon of HeN mice but not in HeJ mice compared with their respective controls. In addition, HeN mice showed higher levels than HeJ mice after stress exposure (Figure 33A). We also measured IgA levels after two days of stress. IgA levels were decreased in both groups of mice after stress exposure but only the HeJ group reached significant differences compared with its control. No differences were found between both stressed strains of mice (Figure 33B).

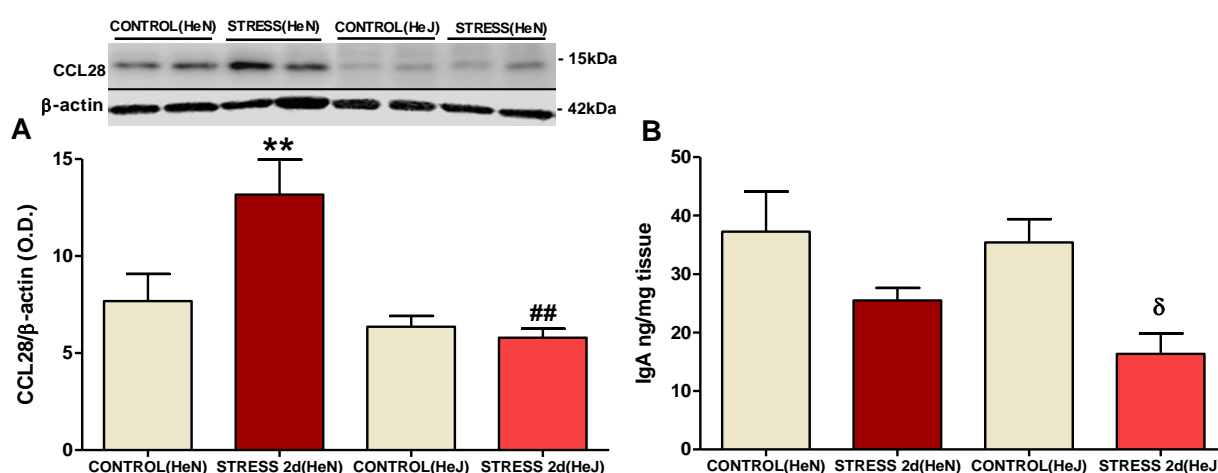


Figure 33. Intestinal levels of CCL28 increased in HeN mice, while IgA levels decreased after two days of stress in HeJ animals. WB of CCL28 (A) and IgA levels (B) quantification. Densitometric analysis of the respective band in colonic samples of control and stressed HeN and HeJ mice. The densitometric data are normalized by β -actin (lower band) and are representative of 3 experiments. Data are mean \pm SEM of 6-8 mice per group. ** $p < 0.01$ vs. CONTROL(HeN); ## $p < 0.01$ vs. STRESS(HeN); δ $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeJ). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test. O.D.: optical density.

2.5. EFFECT OF INTESTINAL DECONTAMINATION ON STRESS-INDUCED TLR-4 ACTIVATION IN HeN MICE

To verify if stress-induced TLR-4 pathway activation observed in HeN mice results from intestinal translocation of Gram – microorganisms, we studied the effect of gut decontamination in these animals. The decontamination protocol used consists in an antibiotic treatment administered from the first day of stress in drinking water, consisting in ciprofloxacin following previous protocols (Velders et al., 2004).

We observed that antibiotic decontamination decreased stress-induced LBP levels in plasma (Figure 34). Furthermore, there is no bacterial translocation in the tissues studied, MLNs, spleen, liver or blood of HeN mice treated with antibiotic (data not shown).

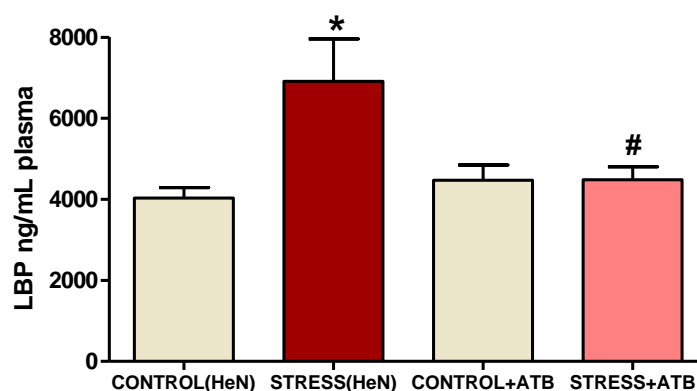


Figure 34. Intestinal decontamination prevented increased LBP in plasma.

LBP plasma levels of control and 4 days stressed HeN mice with or without antibiotic. Data are mean \pm SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN); # $p < 0.05$ vs. STRESS(HeN). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test.

In addition, the blocking effect of bacterial decontamination in HeN animals is extended to stress-induced TLR-4 and MD-2 respective up-regulation at mRNA and protein level (Figure 35A-D) in mice prefrontal cortex. Antibiotic administration prior stress exposure did not change the mRNA or protein levels of MyD88 (data not shown).

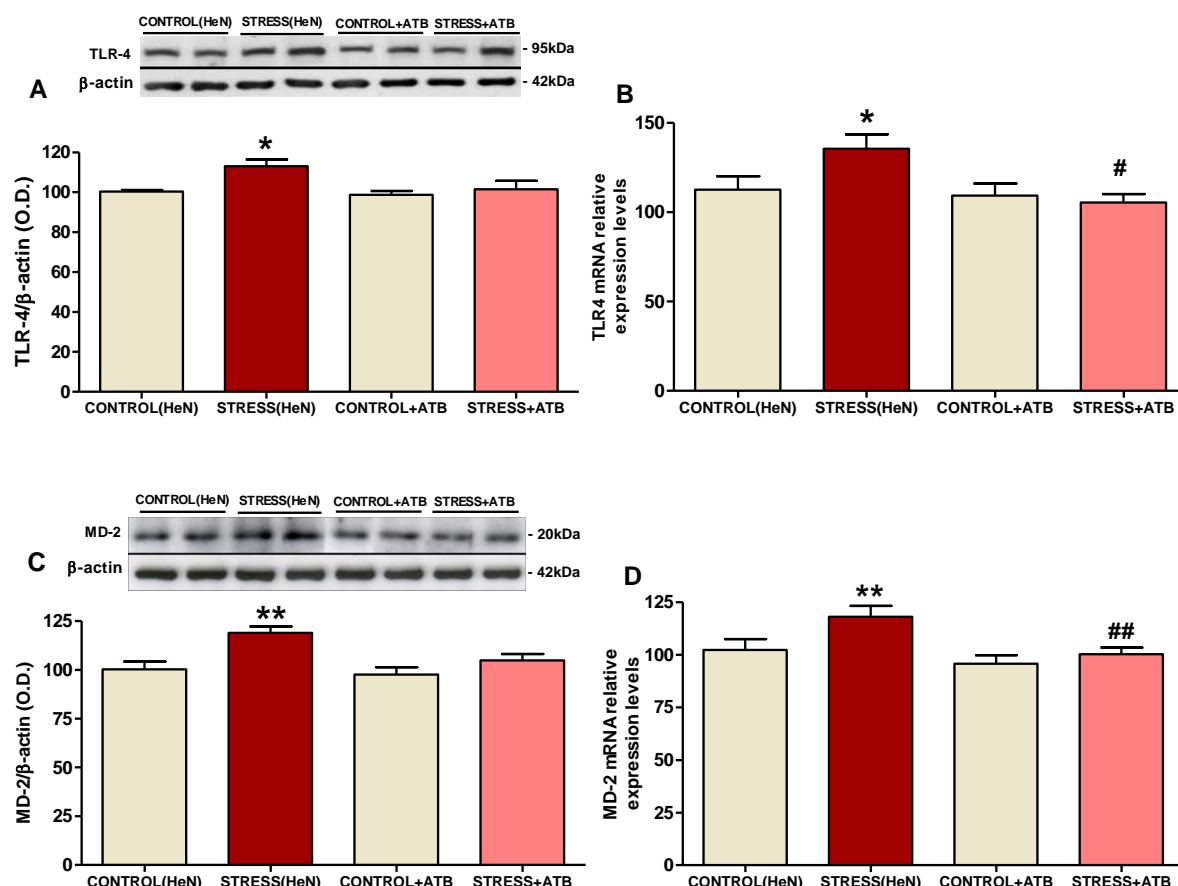


Figure 35. Intestinal decontamination prevented stress-induced TLR-4 signaling pathway activation in brain.

WB and PCR detection of TLR-4 (A-B) and MD-2 (C-D) proteins and mRNAs. Densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples of control and stressed HeN mice with or without antibiotic. The densitometric data are normalized by β -actin (lower band) and are representative of 3 experiments. Data are mean \pm SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. CONTROL(HeN); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. STRESS(HeN). One-way ANOVA following Newman-Keuls *post hoc* test. O.D.: optical density.

2.6. ROLE OF TLR-4 IN THE NEUROINFLAMMATION PRODUCED BY STRESS EXPOSURE IN MICE BRAIN CORTEX

The next goal was to elucidate the possible role of TLR-4 in stress-induced accumulation of inflammatory mediators, comparing the activation of NF- κ B and its related proinflammatory enzymes iNOS and COX-2 in the prefrontal cortex of HeN and TLR-4 deficient (HeJ) mice in control and after stress exposure conditions.

WB studies showed an increase in the expression at protein level of the NF- κ B subunit p65 in nuclear extracts of prefrontal cortex of stressed HeN animals (Figure 36A) On the other hand, exposure to stress did not change p65 nuclear levels of HeJ mice. Complementary studies on p65 transcriptional activity mimic the same pattern in both types of mice (Figure 36B).

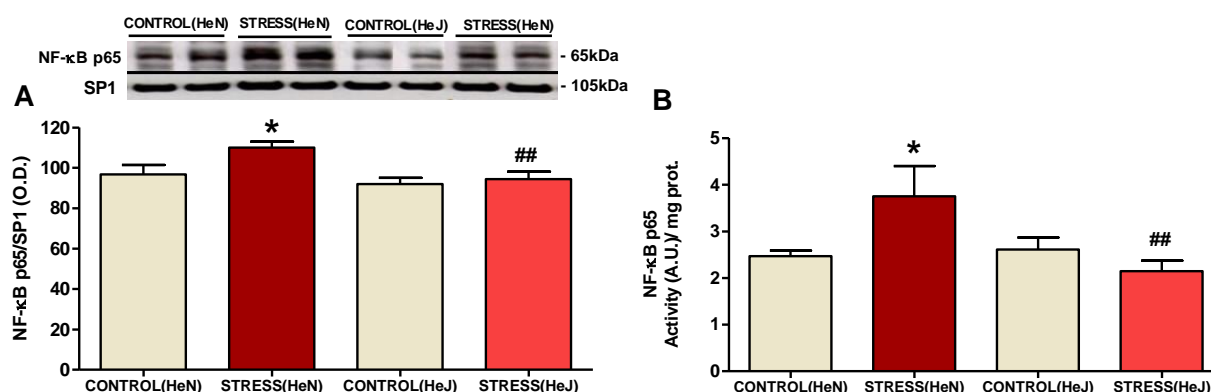


Figure 36. Lack of TLR-4 prevented stress induced NF- κ B expression and activation in prefrontal cortex.

WB (A) and transcriptional activity (B) detection of NF- κ B p65. Densitometric analysis of the bands of interest in prefrontal cortex nuclear extracts samples of control and stressed of control and stressed C3H/HeN and C3H/HeJ mice. The densitometric data are normalized by SP1 (lower band) and are representative of 3 experiments. Data are mean \pm SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$, vs. CONTROL(HeN), ## $p < 0.01$ vs STRESS(HeN). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test. O.D.: optical density; A.U. arbitrary units.

Restraint+acoustic stress also caused an increase in the expression of the inflammatory enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2) at protein (Figure 37A) and mRNA levels in prefrontal cortex (Figure 37B). Similarly, stress increased iNOS expression (Figure 37C) as well as mRNA levels (Figure 37D). However, under stress conditions TLR-4 deficient mice do not show an increase in the protein expression or mRNA levels of these enzymes when compared to their control (Figures 37A-D).

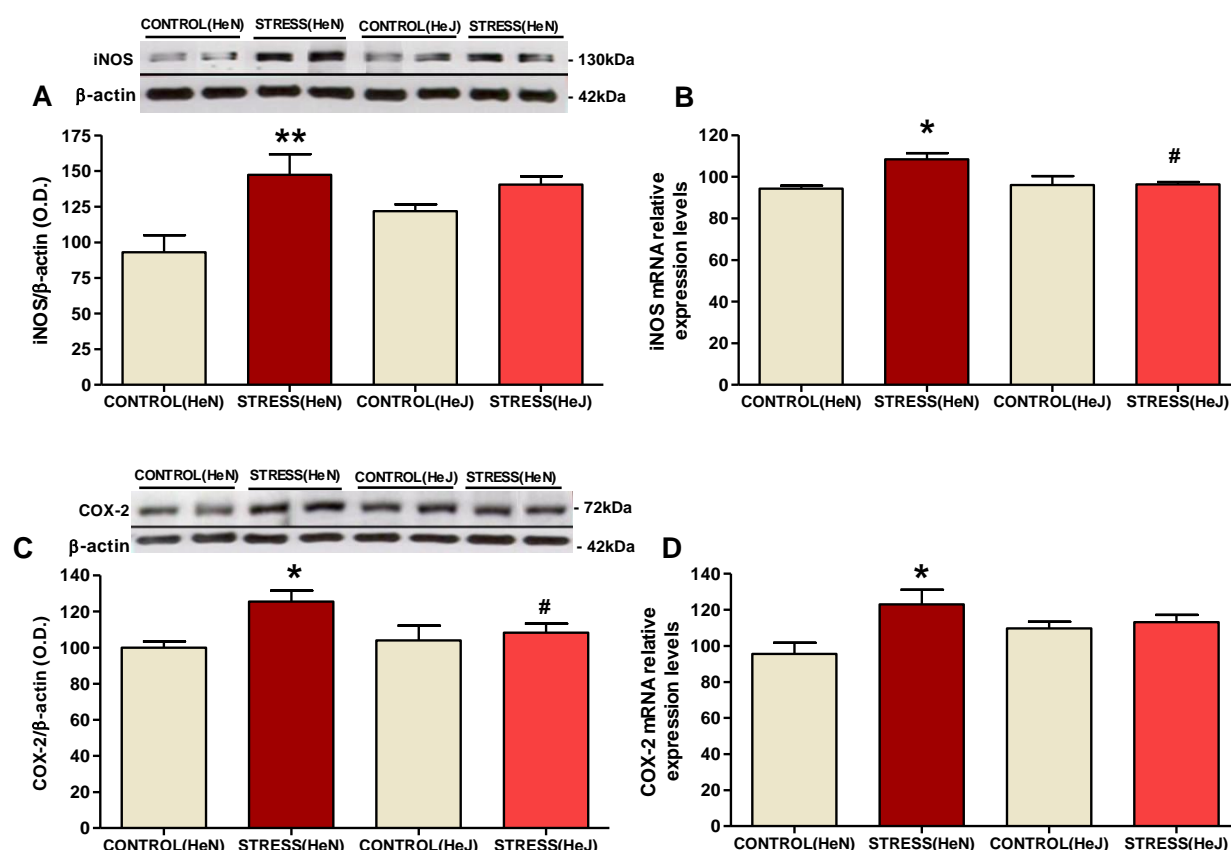


Figure 37. TLR-4 deficiency prevented stress induced COX-2 and iNOS up-regulation in brain.

WB detection of the proinflammatory enzymes iNOS (A) and COX-2 (C) and densitometric analysis of the respective bands of interest in brain cortex samples of control and stressed C3H/HeN and C3H/HeJ mice. The densitometric data are normalized by β-actin (lower band) and are representative of 3 experiments. Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs CONTROL(HeN); # $p < 0.05$ vs STRESS(HeN). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test. OD: optical density. iNOS (B) and COX-2 (D) mRNAs relative levels in brain cortex of control and stressed C3H/HeN and C3H/HeJ mice. Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN); # $p < 0.05$ vs STRESS(HeN). Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test.

In addition, the proinflammatory interleukin 6 (IL-6) was also measured by PCR in the prefrontal cortex, as specific proinflammatory marker. In HeN mice, there is an increase of this cytokine after stress (Figure 38).

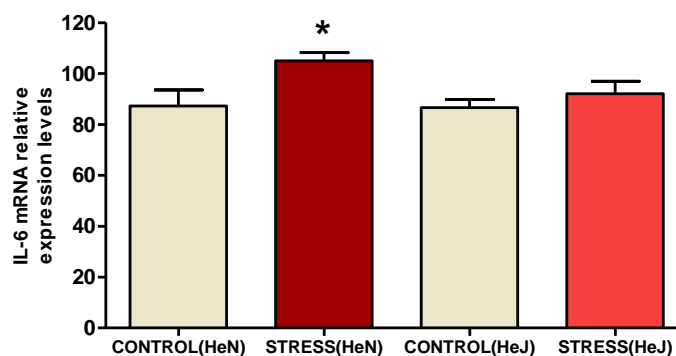


Figure 38. TLR-4 deficiency prevented stress induced IL-6 upregulation in HeN mice.

IL-6 mRNA relative levels in brain cortex of control and stressed C3H/HeN and C3H/HeJ mice. Data represent the mean ± SEM (n=6-8). *p<0.05 vs. CONTROL(HeN); Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test.

We decided to study possible oxidative/nitrosative damage after stress. As a final index of this type of damage that could be produced by stress exposure, we measured the accumulation of the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) in the brain prefrontal cortex of HeN and HeJ mice. MDA increased after stress exposure in HeN mice (Figure 39).

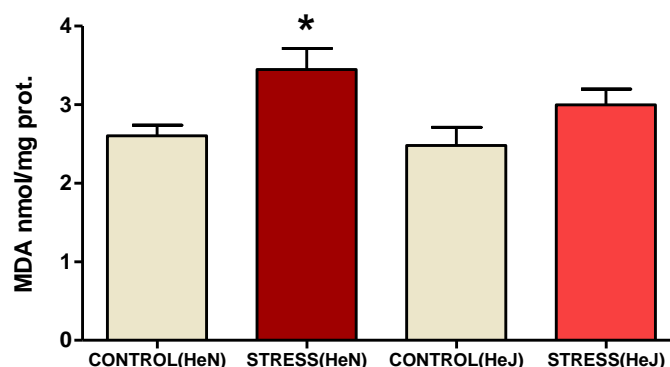


Figure 39. Lack of TLR-4 prevented stress induced lipid peroxidation.

Lipid peroxidation (increase MDA levels) in brain prefrontal cortex in HeN and HeJ mice after stress and in control conditions. Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. *p<0.05 vs. CONTROL(HeN); Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test.

Acute stress exposure also regulates the antiinflammatory activity of PPAR γ in brain prefrontal cortex as a counterbalance mechanism (García-Bueno et al., 2005a). Taking into account that PPAR γ is regulated by TLR-4 activation in other experimental settings (Necela et al., 2008), we explored the possible effect of TLR-4 deficiency on

this antiinflammatory arm of the inflammatory process produced in our model. WB in nuclear extract of prefrontal cortex indicated an increase of PPAR γ in HeJ mice compared with their controls, and RT-PCR studies showed reduced levels of PPAR γ mRNA in brain cortex homogenates of HeN stressed mice compared to their controls. However, stress did not alter PPAR γ mRNA levels in TLR-4 deficient individuals after stress exposure (Figure 40A&B).

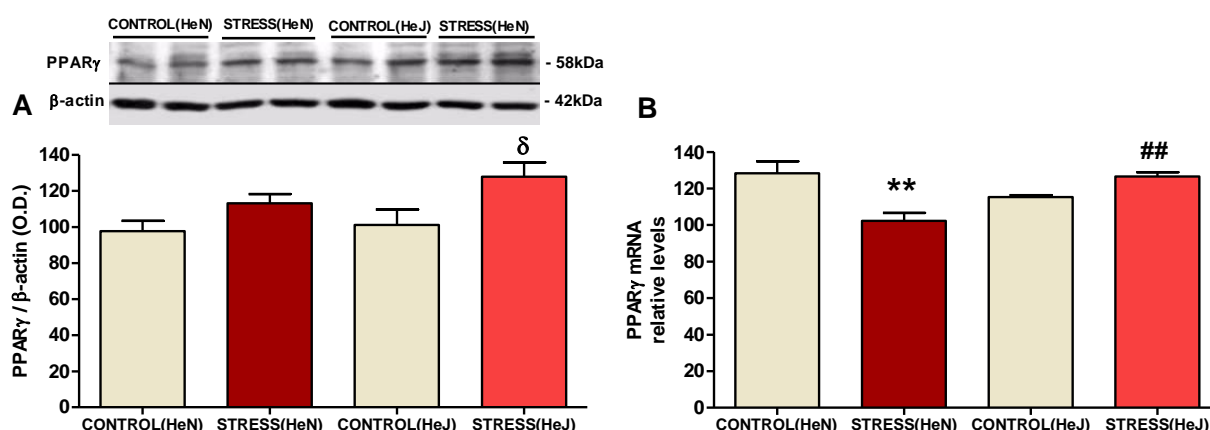


Figure 40. Antiinflammatory PPAR γ up-regulation in HeJ mice.

Protein (A) and mRNA (B) respective levels of PPAR γ . Densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples of control and stressed C3H/HeN and C3H/HeJ mice. The densitometric data are normalized by β -actin (lower band) and the mRNA is normalized by tubulin. Data are representative of 3 experiments. ** $p < 0.01$ vs. CONTROL(HeN), ## $p < 0.01$ vs. STRESS(HeN), δ $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeJ); Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test. OD: optical density.

2.7. INTESTINAL DECONTAMINATION EFFECT ON STRESS-INDUCED NEUROINFLAMMATION IN HeN MICE

In addition to the preventive effect of antibiotic treatment TLR-4 signalling pathway activation after stress, the effect of intestinal decontamination on stress-induced neuroinflammation was studied. Interestingly, antibiotic treatment also blocked stress-induced up-regulation and activity of p65 in the prefrontal cortex of HeN mice (Figures 41A&B).

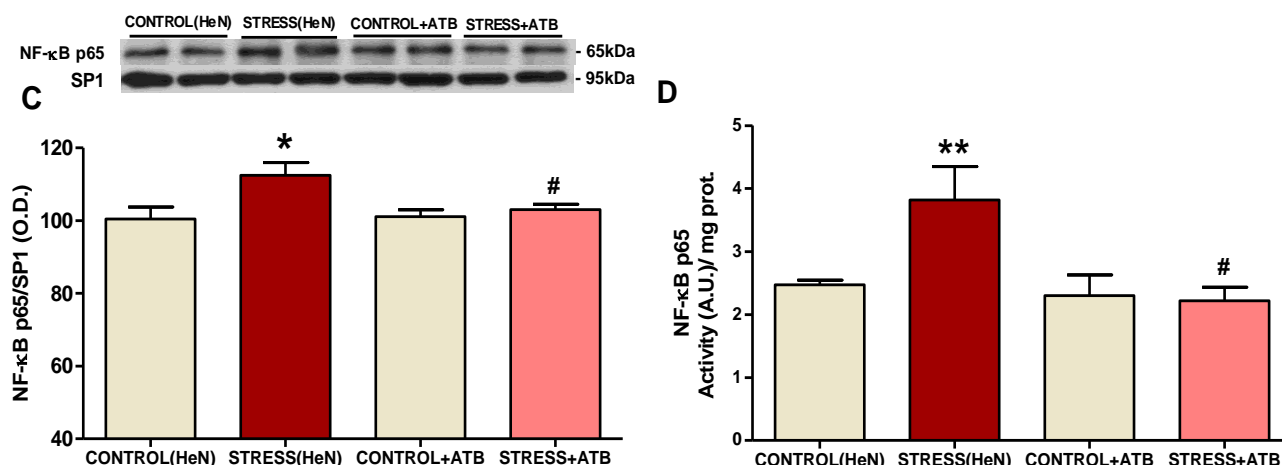


Figure 41. Intestinal decontamination prevented stress-induced NF-κB p65 activity.

WB (A) and activity (B) detection of NF-κB p65. Densitometric analysis of the bands of interest in prefrontal cortex nuclear extracts samples of control and stressed HeN mice with or without antibiotic. The densitometric data are normalized by SP1 (lower band) and are representative of 3 experiments. Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CONTROL(HeN); # $p < 0.05$ vs STRESS (HeN). One-way ANOVA following Newman-Keuls *post hoc* test. OD: optical density.

Taking into account that intestinal decontamination prevented NF-κB increased induced by stress, we verify whether antibiotic administration affects the expression of the inflammatory enzymes COX-2 and iNOS in prefrontal cortex after stress. Similarly, in stressed animals with antibiotic treatment COX-2 and iNOS expression do not show an increase in the protein expression when compared to their control (Figures 42A-B).

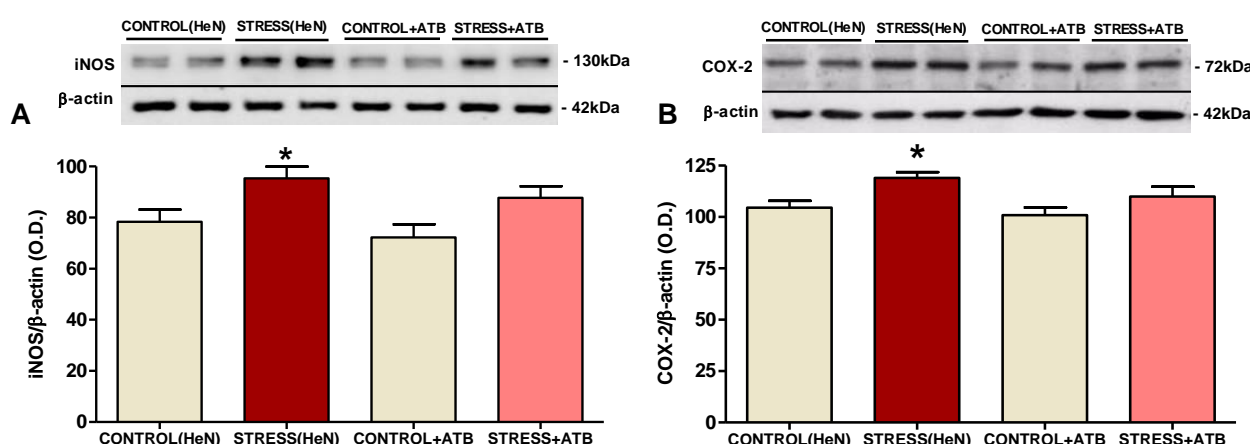


Figure 42. Intestinal decontamination prevented iNOS and COX-2 up-regulation induced by stress.

WB of iNOS (A) and COX-2 (B) proteins and densitometric analysis of the respective bands in brain prefrontal cortex samples of control and stress HeN mice, with and without antibiotic in their drinking water. The densitometric data is normalized by β-actin (lower band) and is representative of 3 experiments. Data are mean ± SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN); One-way ANOVA following Newman-keuls *post hoc* test. OD: optical density.

2.8. ROLE OF TLR-4 IN THE HPA AXIS ACTIVATION ELICITED BY STRESS EXPOSURE

As previously described, stress exposure induced a significative increase in plasma corticosterone levels measured by RIA in HeN mice (287.2 ± 78.90 ng/mL vs. CONTROL(HeN) 76.16 ± 32.31 ng/mL, $p < 0.05$). Interestingly, TLR-4 deficient individuals did not present differences to their controls in plasma corticosterone levels (118.8 ± 22.72 ng/mL vs. CONTROL(HeJ) 145.0 ± 23.81 ng/mL) (Figure 43). In addition, HeN and HeJ mice respective plasma corticosterone levels after stress exposure were very similar, at the moment of blood extraction (Figure 43).

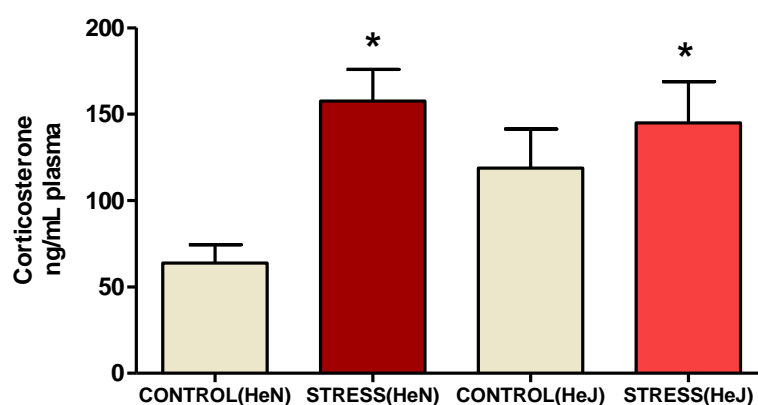


Figure 43. HPA axis activity in HeN and HeJ mice after stress exposure.

Plasma corticosterone levels (ng/mL) under basal and stress conditions in HeN and HeJ mice, in control and stress conditions. Data represent the mean \pm SEM of 6-8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL(HeN); Two-ways ANOVA following Bonferroni *post hoc* test.

3. CHRONIC MILD STRESS IN RATS

These series of experiments were conducted to analyse the effects of Chronic Mild Stress (CMS) exposure on TLR-4 signalling pathway in the rat brain cortex. In addition, the possible regulatory mechanism involved was explored through pharmacological manipulation (i.e. antibiotic intestinal decontamination). Finally, an intestinal decontamination protocol was used to evaluate the role of bacterial translocation on CMS induced neuroinflammation and depressive-like behaviour.

3.1. TLR-4 EXPRESSION AND SIGNALLING IN THE BRAIN PREFRONTAL CORTEX

To evaluate if the TLR-4 pathway is activated after stress exposure we studied the expression of TLR-4 and its co-receptor, myeloid differentiation factor-2 (MD-2). Stress exposure induced a significant increase in TLR-4 at mRNA and protein levels in the brain prefrontal cortex (Figure 44A&B). Similarly, MD-2 was up-regulated after stress (Figure 44C&D).

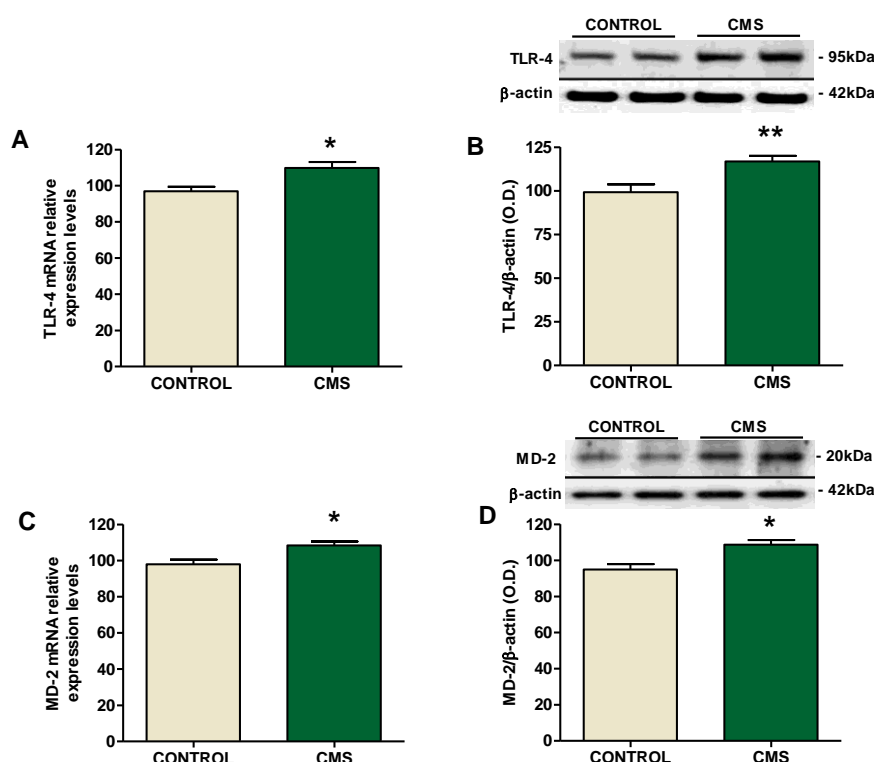


Figure 44. CMS induced the up-regulation of the complex TLR-4/MD-2

mRNA and protein expression levels of TLR-4 (A,B) and MD-2 (C,D) in the prefrontal cortex of control and CMS exposed animals. Data are mean ± SEM of 8-10 rats per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CONTROL (two-tailed t-test).

3.2. POSSIBLE REGULATORY MECHANISM OF TLR-4 ACTIVATION IN THE BRAIN CORTEX

As stated, lipopolysaccharide (LPS) is the main ligand of TLR-4, whose activation switches on intracellular inflammatory pathways. In order to clarify the origin of the stress-induced activation of the TLR-4 pathway, we studied the plasma levels of LPS and LPS binding protein (LBP). CMS exposure produced an increase in both LPS and LBP plasma levels (Figure 45A&B).

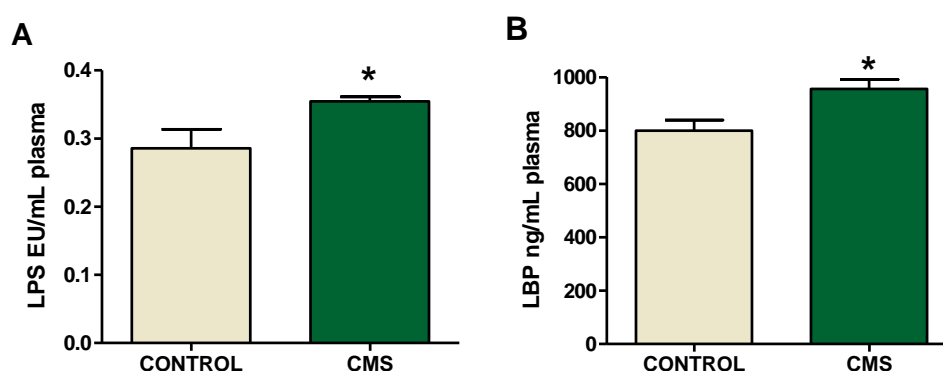


Figure 45. LPS and LBP levels in plasma increased after CMS.

LPS (A) and LBP (B) plasma levels of control and CMS groups. Data are mean \pm SEM of 8-10 rats per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL (two-tailed t-test).

3.3. INFLAMMATORY MEDIATORS IN THE BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER CMS EXPOSURE

TLR-4 activation is followed by stimulation of the proinflammatory transcription nuclear factor κ B (NF- κ B), whose p65 subunit can be determined in cell nuclei to evaluate its activation.

In the conditions of this study, a decreased activity of NF- κ B after CMS exposure was detected (Figure 46A). Similarly, a decrease in the protein expression and the mRNA levels of p65 subunit (Figure 46B&C) was observed in nuclear fractions from the brain cortex of stressed individuals as well. Stress also increased the mRNA expression of the NF- κ B inhibitory protein, I κ B α in the cytoplasm (Figure 46D).

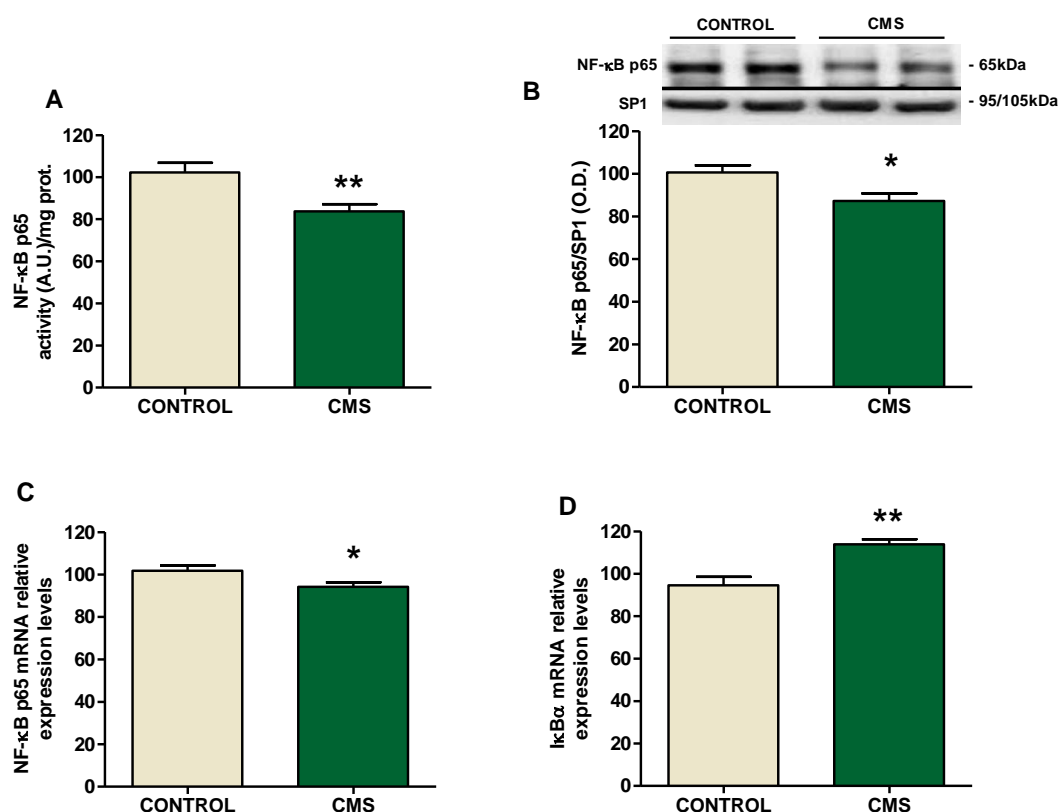


Figure 46: NF-κB p65 activity decreased after CMS.

NF-κB p65 activity (A), protein (B) and mRNA (C) levels in the nuclear fraction of brain prefrontal cortex of control and CMS exposed animals. IκBα mRNA levels in cytoplasmatic fraction of the brain prefrontal cortex in control and CMS (D). Data are mean ± SEM of 8-10 rats per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CONTROL (two-tailed t-test).

The pro-inflammatory enzyme COX-2 was also assessed in control and after stress exposure conditions. An increase in COX-2 mRNA and in the levels of its main product in the brain, PGE₂ was observed after 21 days of chronic stress (Figure 47A&B). Taking into account that stress exposure also activates antiinflammatory pathways to tightly regulate the neuroinflammatory process we decided to measure the levels of the antiinflammatory product of COX-2, 15d-PGJ₂, which decreased in the prefrontal cortex after the CMS exposure (Figure 47C).

Other well known inflammatory agent in the brain activated after TLR-4 stimulation is the proinflammatory cytokine IL-1β (Dantzer et al., 2008) After this particular stress model, an increase in IL-1β mRNA levels was also detected (Fig 47D).

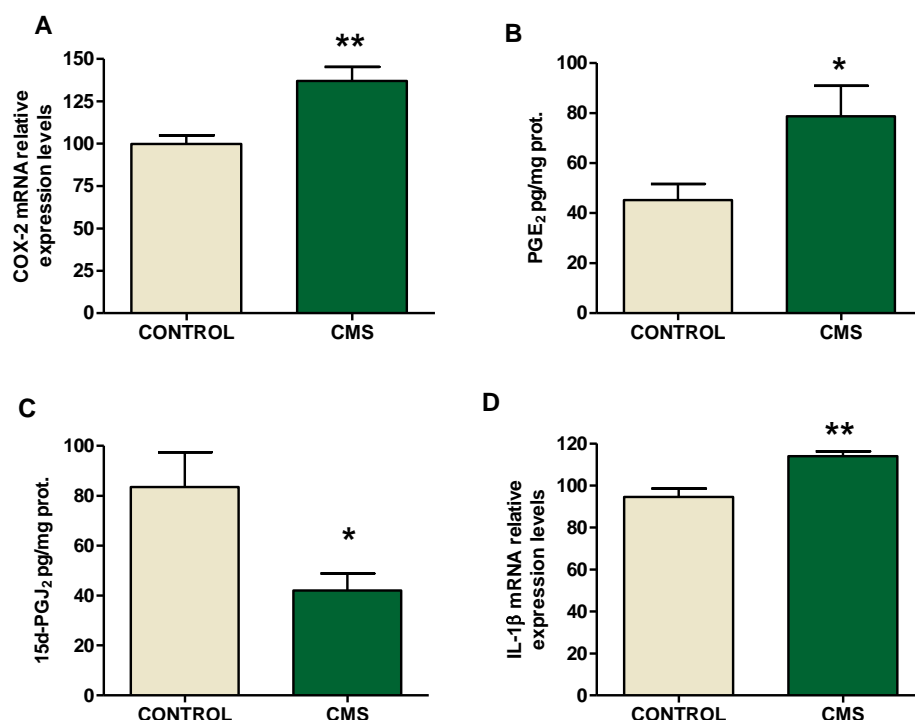


Figure 47. Proinflammatory parameters increased after CMS, and antiinflammatory markers decreased in brain. mRNA expression of COX-2 in control and after CMS (A). Brain levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE₂ (B), the anti-inflammatory one 15d-PGJ₂ (C), and interleukin-1beta (IL-1β) mRNA levels in control and after CMS in the brain prefrontal cortex (D). Data are mean ± SEM of 8-10 rats per group. * p<0.05, ** p<0.01 vs. CONTROL (two-tailed t-test).

3.4. OXIDATIVE/NITROSATIVE DAMAGE IN THE BRAIN PREFRONTAL CORTEX AFTER CMS EXPOSURE

Neither the inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression nor the stable metabolites of nitric oxide (nitrites) levels were modified in the brain cortex after 21 days with CMS (Figure 48A&B).

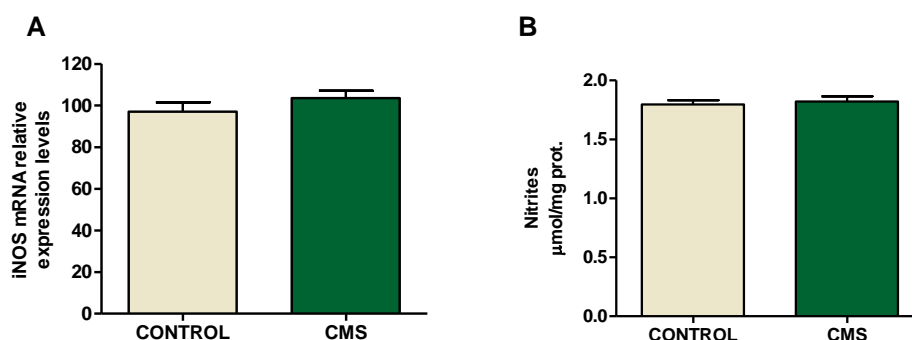


Figure 48. After 21 days of CMS there were no differences in the iNOS and nitrites levels in brain.

mRNA expression of iNOS (A) and brain levels of nitrites (B), in control and after CMS in the cortex. Data are mean \pm SEM of 8-10 rats per group. (two-tailed t-test).

Although these parameters did not change at this time point, we decided to study possible oxidative/nitrosative damage after stress. As a final index of this type of damage that could be produced by CMS exposure, we measured the accumulation of the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) in the brain prefrontal cortex of the different groups of rats. MDA increased after CMS exposure (Figure 49).

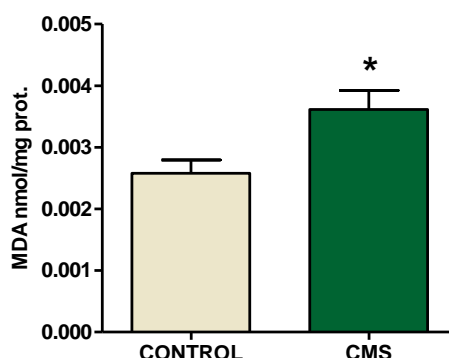


Figure 49. 21 days of CMS induced lipid peroxidation in brain.

Lipid peroxidation in brain after CMS: levels of malondialdehyde (MDA; a marker of the reactive oxygen species attack and the resultant lipid peroxidation) in control rats and after CMS exposure in the brain cortex. Data are mean \pm SEM of 8-10 rats per group. * $p < 0.05$ vs. CONTROL (two-tailed t-test).

3.5. EFFECTS OF INTESTINAL DECONTAMINATION ON CMS-INDUCED INFLAMMATORY AND OXIDATIVE/NITROSATIVE DAMAGE IN BRAIN

In order to evaluate whether the source of LPS (and subsequent TLR-4 activation) were translocated Gram – bacteria from the digestive tract, the effect of intestinal decontamination was assessed in our experimental setting.

The decontamination protocol used consists in an antibiotic (ATB) treatment administered from the first day of stress in drinking water, consisting in penicillin G and streptomycin sulphate following previous protocols (Ando et al., 2000; Caso et al., 2009). Antibiotic decontamination decreased both stress-induced LPS and LBP increase in plasma. The effect of bacterial decontamination on stressed animals was extended to stress-induced TLR-4 and MD-2 up-regulation at protein and mRNA levels, (Figure 49 and Table 3).

Statistical analyses were carried out with all the four experimental groups (control, CMS, control+antibiotic and CMS+antibiotic) but we did not find significative differences between the two control groups and we decided to show just three groups in order to clarify our results.

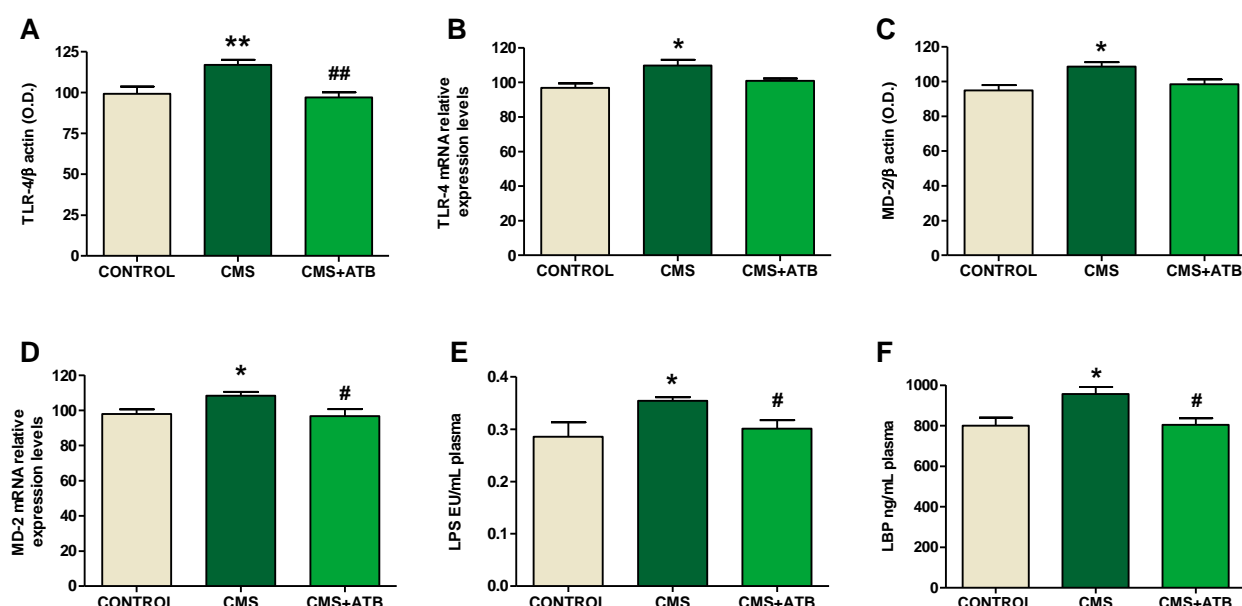


Figure 49: Intestinal decontamination prevented TLR-4/MD-2 up-regulation, and LPS/LBP increase.

Protein and mRNA expression levels of TLR-4 (A,B) and of MD-2 (C,D) in the brain prefrontal cortex of control, CMS and CMS+antibiotic (CMS+ATB) animals. LPS (E) and LBP (F) plasma levels of control, CMS and CMS+ATB animals. Data are mean \pm SEM of 8-10 rats per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. CONTROL, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. CMS. One-way analysis of variance (ow-ANOVA) followed by the Newman-Keuls *post hoc* test.

The effect of decontamination on stressed animals was also observed in all the other inflammatory and oxidative parameters previously determined in the brain tissue (Figure 50A-K and Table3). Interestingly, ATB decontamination also prevented the CMS-induced decrease in the anti-inflammatory 15d-PGJ₂ levels in the brain (Figure 50G and Table 3).

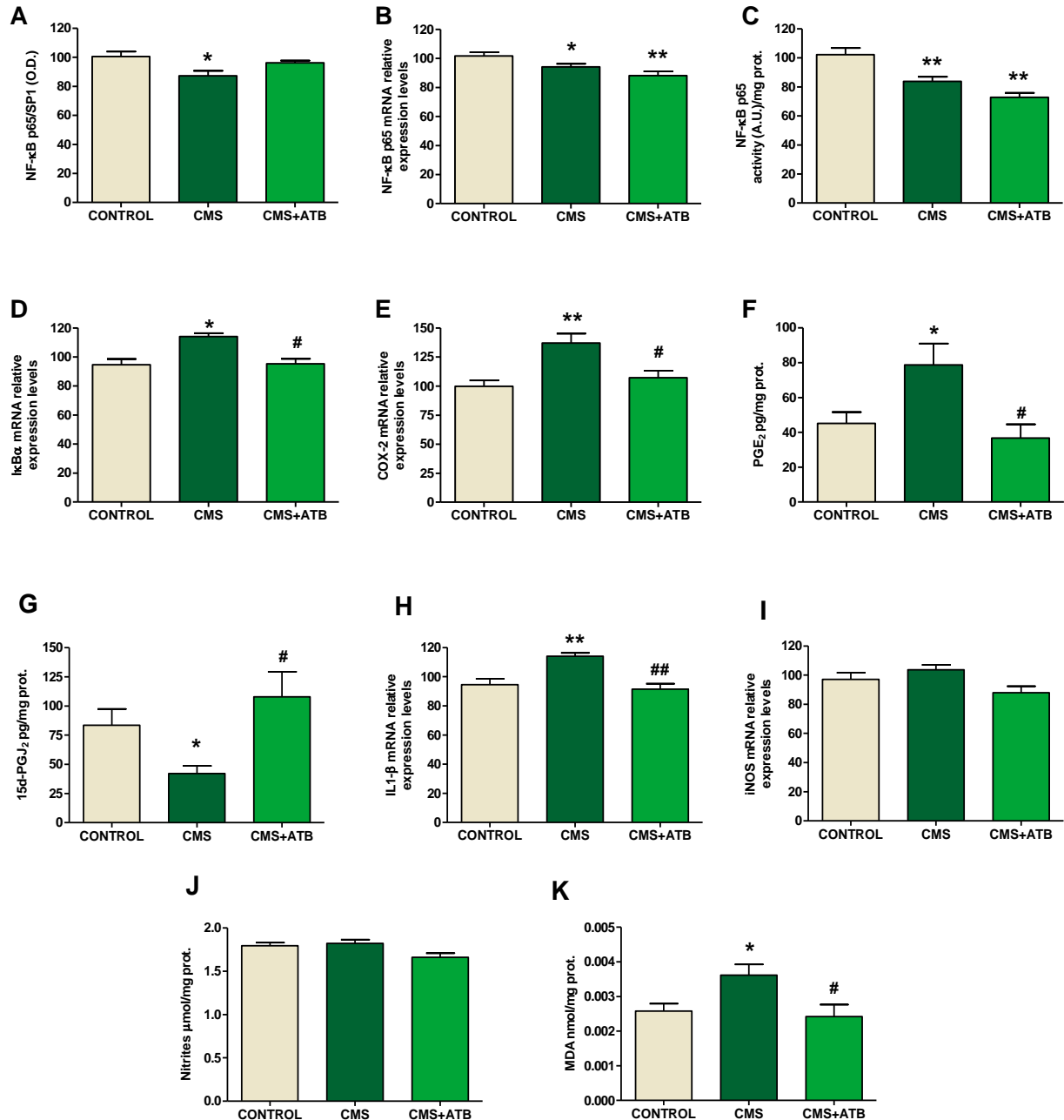


Figure 50: Intestinal decontamination prevented proinflammatory markers increase, and up-regulate antiinflammatory prostaglandin 15d-PGJ₂.

NF-κB p65 protein, mRNA and activity in the brain prefrontal cortex of control, CMS and CMS+ATB animals (A,B&C). mRNA expression of IκBα and COX-2 (D&E) and brain levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE₂ (F) and the anti-inflammatory one 15d-PGJ₂ (G) in the brain prefrontal cortex of control, CMS and CMS+ATB animals. Interleukin-1beta (IL-1β) (H) and iNOS (I) mRNA relative levels in brain cortex of CMS in rats with and without antibiotic treatment, levels of nitrites and MDA after CMS in animals with drinking water or with the antibiotic treatment. Data are mean ± SEM of 8-10 rats per group. * p<0.05, ** p<0.01 vs. CONTROL, # p<0.05, ## p<0.01 vs. CMS. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls *post hoc* test.

3.6. EFFECTS OF CMS AND INTESTINAL DECONTAMINATION ON THE PLASMA CORTICOSTERONE LEVELS

Chronic mild stress exposure increased plasma corticosterone levels when compared to control group. Antibiotic (ATB) treatment decreased corticosterone levels of chronically stressed rats (CMS+ATB group) and these CMS+ATB animals did not show differences in the plasma corticosterone levels when compared to the control (non stressed) group, showing that the intestinal decontamination inhibits the increase of corticosterone induced by the CMS protocol (Figure 51).

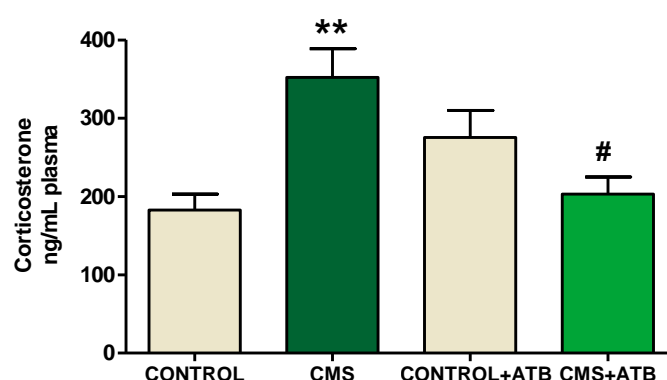


Figure 51. Antibiotic treatment decreased corticosterone plasma levels after CMS.

Plasma corticosterone levels of CONTROL, CMS exposed, control+intestinal antibiotic decontamination (CONTROL+ATB) and CMS+ATB animals. Data are mean \pm SEM of 8-10 rats per group. ** $p < 0.01$ vs. CONTROL; # $p < 0.05$ vs. CMS. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls *post hoc* test.

3.7. EFFECTS OF CMS AND INTESTINAL DECONTAMINATION ON THE DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOUR

After 21 days following the CMS protocol, separate groups of animals ($n=10$) were exposed to the modified forced swimming test (mFST). Data showed that after CMS exposure rats elicited a pro-depressive behaviour (Figure 52A): the immobility time was significantly increased in CMS; there is also a significant decrease in the swimming time compared to the control group. The analysis of the time climbing did not reveal significant differences between groups. Furthermore, weight loss and number of faecal boli were increased in CMS (Figure 52B&C). However, in spite of the anti-inflammatory effects demonstrated in the brain by the antibiotic intestinal

decontamination protocol used, ATB did not modified immobility or swimming behaviours after mFST in stressed animals (Figure 52A).

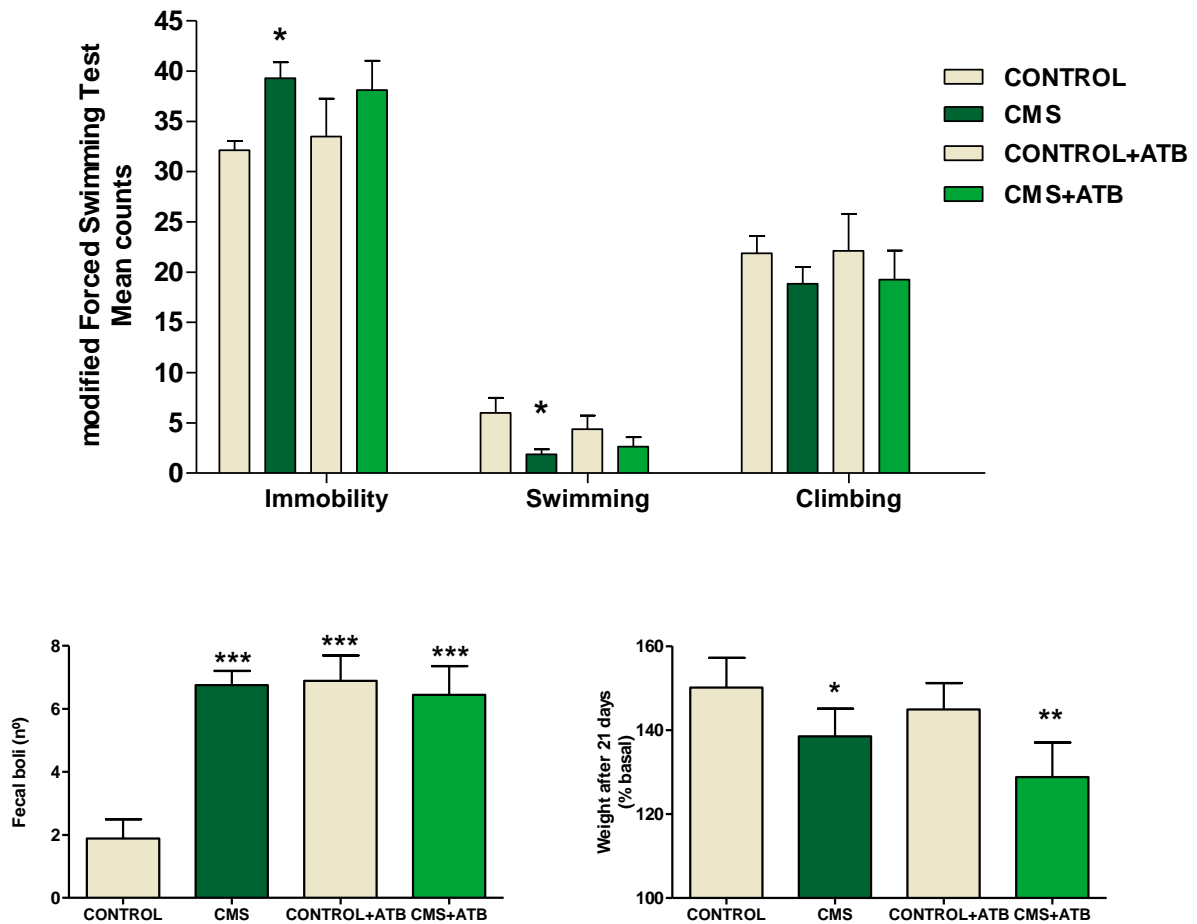


Figure 52. Intestinal decontamination did not prevent stress-induced depressive-like behaviour.

Behavioural parameters (time in immobility, swimming and climbing –in seconds–) during modified forced swimming test (mFST) (A), weight change after 21 days of CMS exposure (B) and fecal boli (number) (C). Data are means \pm SEM of 9-10 rats per group; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. CONTROL. One-way ANOVA following Newman-Keuls *post-hoc* test.

These results are summarized in the following Table.

	CONTROL	CMS	CONTROL+ATB	CMS+ATB
Plasma determinations				
LPS (EU/mL)	0.2856 ± 0.027	0.3546±0.006**	0.248 ± 0.022	0.3008±0.016 [#]
LBP (ng/mL)	799.8 ± 39.75	955.6 ± 35.57*	840.0 ± 19.52	804.2 ± 32.97 [#]
Brain determinations				
TLR-4 (mRNA)	96.84 ± 2.618	109.8 ± 3.285**	102.5 ± 2.703	101.0 ± 1.278
TLR-4 (OD) (protein)	99.26 ± 4.455	116.9 ± 3.093**	88.09 ± 4.142	97.01 ± 3.162 ^{##}
MD-2 (mRNA)	98.01 ± 2.575	108.4 ± 2.178**	91.74 ± 2.432	96.86 ± 3.912 [#]
MD-2 (OD) (protein)	94.94 ± 2.977	108.6 ± 2.578*	102.6 ± 2.842	104.9 ± 4.381
NF-κB p65 Activity (% Control)	100.0 ± 4.571	85.48 ± 3.277*	96.73 ± 15,33	71.66 ± 3.1**
NF-κB p65 (mRNA)	101.8 ± 2.546	94.21 ± 2.193*	90.28 ± 2.052	88.16 ± 2.879
NF-κB p65 (OD) (protein)	100.6 ± 3.363	87.23 ± 3.554*	103.2 ± 4.530	99.43 ± 3.442 [#]
IκBα (mRNA)	100.0 ± 4.286	118.7 ± 6.436*	95.55 ± 3.265	99.42 ± 5.101 [#]
COX-2 (mRNA)	99.89 ± 5.056	137.2 ± 8.159**	124.6 ± 7.084	107.1 ± 6.181 [#]
PGE ₂ (pg/mg prot.)	45.14 ± 6.485	78.69 ± 12.24*	48.58 ± 8.973	36.75 ± 7.877 [#]
15d-PGJ ₂ (pg/mg prot.)	83.45 ± 13.99	42.00 ± 6.775*	83.28 ± 13.78	107.8 ± 21.68 [#]
IL-1β (mRNA)	94.59 ± 4.000	114.0 ± 2.318**	95.91 ± 9.424	91.35 ± 3.886 ^{##}
MDA (nmol/mg prot.)	0.00279 ± 0.000256	0.00372 ± 0.000285*	0.00187 ± 0.000142	0.00242 ± 0.000344 ^{##}

Data are mean ± SEM of 8-10 rats per group. * p<0.05, ** p<0.01 vs. CONTROL, # p<0.05, ## p<0.01 vs. CMS. One-way Analysis of variance followed by the Newman-Keuls *post hoc* test.

IV. DISCUSIÓN

1. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: ESTUDIO FARMACOLÓGICO
2. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE
3. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: IMPLICACIONES TRASLACIONALES
4. DISCUSIÓN GLOBAL

1. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: ESTUDIO FARMACOLÓGICO

Los resultados de este estudio confirman la respuesta inflamatoria y la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos que tiene lugar en la corteza prefrontal cerebral en ratas expuestas a un estrés agudo por inmovilización. No obstante, los datos más novedosos indican un papel clave del receptor TLR-4 en la neuroinflamación inducida por el estrés. Se ha demostrado que el bloqueo farmacológico del receptor TLR-4 durante la exposición a estrés con un inhibidor (TAK-242) reduce los parámetros oxidativos/nitrosativos e inflamatorios estudiados. En lo que se refiere a la traslocación bacteriana intestinal, como se había observado en modelos similares (Ponferrada et al., 2007), tiene lugar tras el estrés pero, en este caso, la administración del inhibidor no modifica este proceso.

De manera preliminar se realizó un estudio temporal de la respuesta inflamatoria al estrés para decidir el tiempo de exposición a estrés que se utilizaría en el posterior estudio farmacológico.

Los animales control presentan iNOS y COX-2 en la corteza prefrontal. En el caso de COX-2 se trata de una enzima inducible que es constitutiva en algunas regiones del organismo como ciertas regiones cerebrales, entre ellas la corteza prefrontal. La iNOS, sin embargo, ha sido inducida probablemente por la manipulación de los animales control, aunque los niveles son muy bajos comparado con el protocolo de estrés.

Todas las medidas realizadas guardan relación con la vía de señalización de TLR-4 (rev. en Takeda y Akira, 2007). Los primeros parámetros analizados (iNOS, COX-2, NF- κ B e I κ B α) han sido ampliamente estudiados en distintos modelos de estrés y su aumento era esperado (rev. en García-Bueno et al., 2008); sin embargo, el aumento de la expresión de TLR-4 en corteza prefrontal y de los niveles plasmáticos de la LBP (la proteína de unión a LPS), creemos que son, la primera descripción de esta activación en dichas condiciones experimentales. Resulta interesante ver que el patrón temporal de expresión de los parámetros estudiados es coherente con la vía de señalización del TLR-4: nuestros datos confirman que el primer parámetro en aumentar es la LBP tras dos horas de exposición a estrés, este aumento es mayor tras 6 horas y se mantiene, aunque menos intenso cuando el protocolo es de 4 días.

En concreto, cuando la vía del TLR-4 se activa por LPS, el primer paso en su reconocimiento se da a nivel periférico por la LBP, que contribuye a la detección del

LPS, uniéndose al receptor, facilitando y acelerando el reconocimiento de la endotoxina por el primer factor del complejo receptor, el CD14 (Tobias et al., 1992; Hailman et al., 1994). Sin embargo, diversos factores pueden aumentar la expresión de la LBP, es el caso de varias citoquinas proinflamatorias y del glucocorticoide sintético dexametasona (Wan et al., 1995; Kirschning et al., 1997). Se trata de mediadores que aumentan en situaciones de daño (trauma, infección), y también en situaciones de estrés. En nuestro caso, no podemos afirmar que el aumento de LBP se deba exclusivamente a la presencia de bacterias, aunque en anteriores estudios se ha confirmado que el aumento de los niveles de LBP permitiría la detección de pequeñas cantidades de LPS, lo que conllevaría una respuesta inflamatoria rápida (Jack et al., 1997).

El receptor TLR-4 no aumenta su expresión hasta las seis horas de exposición a estrés, así que es posterior al incremento de LBP plasmático, siguiendo el que parece ser el orden lógico de la vía de señalización. Este dato es difícil de comparar con los aportados por otros estudios. La mayoría de los experimentos sobre TLR-4 utilizan como estímulo LPS y las medidas de la proteína son escasas, en general se analiza el ARN mensajero obteniéndose, sin embargo, datos contradictorios (Laflamme y Rivest, 2001; Lehnardt et al., 2002). El único estudio realizado en un modelo de estrés por inmovilización sobre expresión de TLR-4 es difícilmente comparable al nuestro, puesto que la inmovilización es de 12 horas seguidas dos días, y el TLR-4 se estudió por PCR en muestras de bazo (Zhang et al., 2008). No obstante, los datos coinciden con nuestro estudio pues observan un aumento de TLR-4 tras el estrés.

Como se ha comentado anteriormente, otros estudios muestran que la expresión de TLR-4 puede estar regulada por diversos mediadores relacionados con la respuesta al estrés, como es el caso de las proteínas de choque térmico (HSP) (Tsan y Gao, 2004) o el glutamato, aminoácido excitador, que se libera durante el estrés y regula la expresión de TLR-4 de manera dependiente de su receptor NMDA tras una administración sistémica de LPS (Glezer et al., 2003). La adrenalina y la noradrenalina, que también son mediadores de la respuesta a estrés, regulan el TLR-4 en macrófagos a través de su receptor β_2 -adrenérgico (Kizaki et al., 2008; Du et al., 2012). Estos últimos datos sugieren la existencia de un mecanismo de regulación del sistema inmune dependiente del Sistema Nervioso Simpático.

La expresión de la subunidad p65 del factor nuclear NF- κ B y su inhibidor, I κ B α alcanzan su máxima variación a las 6 horas. Sin embargo, estas no se mantienen en un protocolo más prolongado, lo que parece indicar que el organismo tiende a

compensar estas variaciones rápidamente. Las enzimas proinflamatorias iNOS y COX-2 también alcanzan su máximo a las seis horas de estrés, aunque el aumento se mantiene en el protocolo de 4 días.

Teniendo en cuenta estos datos, elegimos el protocolo de una sola sesión de estrés durante seis horas para analizar el papel de TLR-4 utilizando una herramienta experimental, el TAK-242, que actúa inhibiendo de manera específica la vía de señalización de TLR-4, bloqueando su dominio intracelular pero sin interferir en la unión extracelular al lipopolisacárido (LPS), de manera que se da la unión a sus ligandos, pero esta no desencadena la cascada de señalización intracelular (Kawamoto et al., 2008). En estudios *in vivo* se ha comprobado que en presencia del LPS, el TAK-242 tiene un efecto antiinflamatorio, pues disminuye multitud de parámetros proinflamatorios y oxidativos, así como el índice de mortalidad (Sha et al., 2007).

Para confirmar que los animales tratados con el inhibidor de TLR-4 presentaban una correcta respuesta al estrés medimos la corticosterona plasmática tras 6 horas de inmovilización: los animales tratados con TAK-242 no presentaban niveles elevados de corticosterona, contrariamente a lo esperado. Para aclarar el origen de esta respuesta anómala, realizamos un protocolo de estrés de seis horas con extracciones de sangre a distintos tiempos. Los animales con el TLR-4 inhibido sí que responden al estrés con un aumento de corticosterona plasmática a la hora, pero vuelven a niveles basales antes que los individuos que recibieron vehículo. Una posible explicación para este fenómeno puede basarse en la presencia de TLR-4 en las glándulas adrenales. A este nivel, cuando el TLR-4 se estimula con LPS induce la secreción de glucocorticoides (Vakharia y Hinson, 2005; Martínez Calejman et al., 2011). Es posible que parte del aumento observado en los animales sin tratamiento se deba a la activación de estos receptores, y que al bloquearse se observe el efecto del *feedback* negativo de los GC sobre el eje HPA, que se traduce en la disminución de corticosterona plasmática a las seis horas de exposición a estrés.

La actividad de la subunidad p65 del NF- κ B no cambia de manera significativa después del estrés. Este dato sorprendente puede explicarse por el aumento que se observa en la expresión del mRNA de su proteína inhibidora I κ B α , lo que nos indica que probablemente la activación se haya dado con anterioridad, ya que la regulación de I κ B α es dependiente de la subunidad p65 del NF- κ B (Sun et al., 1993). En el caso de los animales tratados con TAK-242, vemos que tras la inmovilización la actividad de NF- κ B p65 disminuye, mientras que I κ B α no varía. El comportamiento del factor de

transcripción y de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ es completamente distinto según el tratamiento, lo que sugiere una regulación de NF- κB a distintos niveles, mientras que animales con vehículo estarían en una fase de inhibición de la vía tras su activación, los que tienen el TLR-4 bloqueado no llegarían a activarla.

Los parámetros inflamatorios y oxidativos/nitrosativos estudiados indican que el bloqueo de TLR-4 inhibe su expresión. Cuando los animales son tratados con TAK-242 no se observa el aumento de las enzimas proinflamatorias iNOS y COX-2, ni de la citoquina proinflamatoria IL-6 inducido por estrés. Esto se corresponde, y podría tener implicaciones terapéuticas, con el dato de peroxidación lipídica, que aumenta tras 6 horas de estrés confirmando el daño celular, mientras que los tejidos de los animales tratados no muestran peroxidación lipídica, por lo que puede aventurarse un efecto citoprotector de esta manipulación farmacológica.

El hecho de que el receptor TLR-4 aumente su expresión con la exposición a estrés y que su bloqueo impida esta regulación al alza, confirma la implicación de esta vía en la respuesta a estrés. Estos datos sugieren que el bloqueo del receptor TLR-4 presenta un potencial citoprotector en cerebro en situaciones patológicas que tengan un componente neuroinflamatorio.

Por último, buscamos un origen de la activación de la vía de TLR-4 en la traslocación bacteriana intestinal. Este proceso se confirma por la presencia de bacterias viables que forman parte de la flora intestinal normal de la rata en los ganglios linfáticos del mesenterio como en estudios anteriores en el mismo modelo de estrés (Ponferrada et al., 2007). Otro dato que apoya la idea de traslocación bacteriana intestinal es el aumento en la expresión de LBP en las células hepáticas, medida habitual para comprobar aumentos de expresión de esta proteína hepática de fase aguda (Li et al., 2003), aunque otros tejidos también pueden expresar LBP (Fang et al., 2004). En ambas medidas, bacterias viables y LBP, el estrés actúa del mismo modo independientemente del bloqueo del TLR-4 con TAK-242, produciendo un aumento de mRNA de LBP y presencia de bacterias en todos los animales estresados. Sorprendentemente, 2 animales control con el TLR-4 bloqueado también traslocan y, sin ser significativo, observamos un aumento de LBP en este grupo.

Con los resultados de traslocación bacteriana y LBP no se puede afirmar que la activación de la vía de TLR-4 se deba a la traslocación de bacterias, pero tampoco debe descartarse el hecho de que pasen elementos bacterianos, especialmente LPS, que podrían activar la vía de señalización. El TLR-4 es considerado un “centinela” en el organismo que se activa en muy diversas situaciones de peligro (Mollen et al.,

2006). El estrés podría ser una de estas situaciones. De hecho, como se ha comentado anteriormente existen mediadores liberados en el estrés capaces de activar esta vía, como las HSP, el glutamato o la NA.

Es posible que no se observe ningún efecto claro en la traslocación porque el inhibidor no haya actuado a nivel gastrointestinal, ya que estudios previos han demostrado que el TLR-4 está implicado en la fisiopatología de las uniones intercelulares de la pared intestinal, y además se regula por la CRH protegiendo a los animales en un modelo experimental de colitis ulcerosa (Chaniotou et al., 2010).

Una de las limitaciones del modelo es que el TAK-242 es un fármaco del que no se tiene aún información completa sobre su farmacocinética y se desconocen el alcance del bloqueo y la duración de su efecto.

En resumen, estos resultados sugieren que la exposición a estrés induce una activación de la vía de TLR-4, que puede estar originada en el paso de bacterias o productos bacterianos a través del intestino. La activación de esta vía parece ser responsable en parte de la neuroinflamación inducida por estrés, lo que implicaría que el bloqueo del receptor sea potencialmente neuroprotector.

2. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Una de las maneras de solventar las limitaciones del modelo farmacológico anterior era realizar un estudio con animales transgénicos (C3H/HeJ). En este modelo, los TLR-4 no son funcionales en ningún tejido de su organismo.

Los resultados de este estudio demuestran que el modelo de estrés subcrónico regula al alza la vía de TLR-4 y sugieren un papel clave del TLR-4 en la traslocación bacteriana y en la neuroinflamación en corteza prefrontal, ambas inducidas por estrés. De manera que la relación se da en ambos sentidos, por un lado TLR-4 regula la traslocación bacteriana intestinal, y por otro, las bacterias traslocadas activan TLR-4.

Se ha demostrado que la falta de TLR-4 funcional durante la exposición al estrés impide la traslocación al núcleo del factor nuclear NF- κ B y el incremento de los

parámetros oxidativos/nitrosativos e inflamatorios estudiados en cerebro. En el lado opuesto, la disminución del mediador antiinflamatorio PPAR γ inducida por estrés en los animales HeN o *wild-type* (WT) no tiene lugar en los que carecen de TLR-4 funcional (HeJ). En lo que se refiere a la traslocación bacteriana intestinal, apenas se induce por el estrés, pero en este caso la falta de TLR-4 conlleva una fuerte traslocación tras dos días de estrés con un estado más “desprotegido” de la mucosa intestinal.

Los experimentos en animales WT con descontaminación intestinal con antibiótico indican un papel crucial de las bacterias traslocadas gastrointestinales en la activación de la vía de TLR-4 y en la inflamación subsiguiente en corteza prefrontal.

Durante los últimos años, se ha observado que el cerebro controla el estado inmune del organismo a través de distintos mecanismos que involucran al TLR-4 localizado en células endoteliales y órganos circumventriculares (Singh y Jiang, 2004; Dantzer et al., 2008). Se realizó un estudio preliminar para confirmar que el LPS circulante inducía las enzimas proinflamatorias estudiadas (iNOS y COX-2) en la corteza prefrontal. Esto sólo sucede en los animales con el TLR-4 intacto, indicando que el aumento de estos mediadores es dependiente de TLR-4.

A continuación se observó que, al igual que el estrés agudo, el estrés subcrónico induce un incremento de la expresión tanto de TLR-4, como de su correceptor MD-2, pero sólo en los animales WT, lo que podría significar una activación de la vía, dependiente del mismo TLR-4. El aumento de MD-2 es interesante, pues esta proteína actúa como correceptor y es necesaria en el reconocimiento del LPS (Shimazu et al., 1999).

Los resultados obtenidos coinciden con otros estudios que demuestran la presencia de TLR-4 en corteza prefrontal en los tipos celulares esperados: en neuronas (Tang et al., 2008), astrocitos (Caso et al., 2007), microglía (Olson y Miller, 2004; Jou et al., 2006) y células endoteliales (Singh y Jiang, 2004; Nagyoszi et al., 2010).

Nuestros resultados sobre el origen del aumento de expresión de TLR-4/MD-2 no fueron concluyentes a los 4 días de estrés, el único parámetro que aumentaba de manera significativa fue la LBP que, como se explicó en el apartado anterior, no sólo responde frente al LPS sino que también se induce por otros mediadores (Wan et al., 1995; Kirschning et al., 1997). Reduciendo el protocolo de estrés a una exposición de 2h al día durante dos días, observamos una tendencia de aumento del LPS plasmático en los ratones HeN tras estrés, aunque no es significativo. Sin embargo, los ratones

HeJ tanto en situación control como tras estrés presentan un fuerte incremento de LPS en plasma.

Los datos de todos los grupos de ratones coinciden con la presencia/ausencia de bacterias viables en los distintos tejidos estudiados, menos los ratones HeJ control que, salvo en un caso aislado, no presentan bacterias en ningún órgano pero sí niveles altos de LPS. Es posible que este LPS se haya ido acumulando a lo largo del tiempo y al no ser reconocido, pues el TLR-4 no es funcional, el organismo no lo elimine. De hecho, los ratones HeJ se caracterizan por una resistencia al LPS y una tendencia a desarrollar infecciones por bacterias Gram-negativas (Poltorak et al., 1998).

El caso de los WT es sorprendente: los niveles de LPS del grupo estresado son mayores que los del control, pero la diferencia no es significativa. La presencia de bacterias (todas las bacterias identificadas forman parte de la flora normal del ratón) sólo se observa claramente en el hígado, aunque en menor cantidad que en los HeJ, lo que se corresponde con los datos de LPS. Esto indica que la traslocación bacteriana inducida por estrés ha tenido lugar en los ratones estresados, en los HeJ se encuentra un número elevado de bacterias viables en varios órganos, mientras que apenas se observa en los HeN fuera del hígado. Una explicación posible es que los WT sí que han tenido traslocación, pero ésta es anterior al momento de la toma de muestras y las bacterias que han pasado ya han sido eliminadas, pues el sistema de reconocimiento (TLR-4) no está alterado.

Otros estudios en modelos de colitis ulcerosa con animales *knock out* para TLR-4 coinciden con nuestros resultados, pues los animales con la mutación para TLR-4 presentan mayor traslocación bacteriana (Fukata et al., 2005).

El estudio de la quemoquina CCL28, que regula la migración de células secretoras de la Inmunoglobulina A (IgA) en el colon, y de los niveles de IgA en estos animales esclareció parte de lo observado. La disminución de la IgA tras la exposición a estrés en la mucosa gastrointestinal se ha demostrado en otros modelos de estrés (Ponferrada et al., 2007). Esta inmunoglobulina es la primera línea de defensa frente a patógenos en las mucosas, y su disminución en los ratones sin TLR-4 funcional podría contribuir a la traslocación bacteriana, mientras que los WT presentan niveles mayores de IgA, probablemente por acción de la CCL28 que está aumentada. De manera que la defensa frente a patógenos de la mucosa gástrica está reducida sólo en los HeJ, lo que podría favorecer la traslocación. Este mecanismo podría ser en parte responsable de las diferencias de traslocación encontradas entre los ratones HeN y HeJ

estresados. Una conclusión interesante es que el aumento de CCL28 y el consiguiente mantenimiento de los niveles de IgA estarían mediados por TLR-4, pues los animales cuyo receptor no es funcional no presentan más CCL28 tras el estrés y sus niveles de IgA han disminuido. Además, la región de colon estudiada es la que más receptores TLR-4 presenta (Ortega-Cava et al., 2003). Otros estudios apoyan esta idea, pues animales en los que se induce un aumento de la expresión de TLR-4 que se encuentra activado en condiciones basales en el epitelio intestinal producen mayores niveles de CCL28 y de IgA (Shang et al., 2008).

A continuación el protocolo de descontaminación intestinal muestra que tras cuatro días de exposición a estrés la LBP no aumenta en los animales que recibieron antibiótico, de manera que podemos confirmar que el aumento de LBP en este caso proviene principalmente del LPS en vez de otros mediadores.

Los animales que recibieron un tratamiento de descontaminación intestinal con antibiótico no presentan el aumento de TLR-4 que se observa tras estrés en los no tratados. Este dato coincide con lo observado cuando el TLR-4 no es funcional, de manera que parece confirmarse que la activación del receptor se da por la presencia de bacterias y/o LPS. Este dato confirma las nuevas teorías que defienden que además de los PAMPs, y los DAMPs, hay una tercera categoría de compuestos capaces de activar los receptores de inmunidad innata, los MAMPs (patrones moleculares asociados a microorganismos), formada por compuestos microbianos que provendrían de bacterias comensales (rev. en Mills, 2011).

La activación del factor nuclear NF- κ B se ha observado en protocolos de estrés similares a éste (Zoppi et al., 2011). Su traslocación al núcleo está bloqueada en situación basal por la proteína inhibidora I κ B α , que se degrada cuando la vía se activa permitiendo que NF- κ B llegue al núcleo celular donde promueve la transcripción de genes de proteínas proinflamatorias (Pahl, 1999). Algunos de los genes diana codifican para proteínas que en su actividad producen la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos e inflamatorios, como la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Xie et al., 1994) o la isoforma 2 de la ciclooxigenasa (COX-2) (Appleby et al., 1994; Baldwin, 1996).

El receptor TLR-4 participa en la activación de la vía proinflamatoria de NF- κ B inducida por estrés en la corteza prefrontal de los ratones como demuestran los datos de los animales con el receptor no funcional: cuando TLR-4 no puede unirse a sus ligandos, no se activa el NF- κ B por el estrés.

En el laboratorio en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral, se estudió cómo afectaba a los ratones HeJ un modelo de estrés parecido al utilizado en este estudio. Se observó que la presencia en corteza prefrontal de iNOS, COX-2 y del consecuente daño lipídico (determinado por MDA) tras la exposición al estrés, era menor en HeJ que en los animales WT (Caso et al., 2008). Del mismo modo, en este estudio, los ratones HeJ tampoco muestran el esperado aumento de las enzimas proinflamatorias iNOS y COX-2 que pertenecen a esta vía, igualmente la citoquina proinflamatoria IL-6 aumenta su mRNA con el estrés pero únicamente en ratones HeN. De hecho, el aumento de estos parámetros proinflamatorios es probablemente la causa de la peroxidación lipídica observada en los HeN y la falta de activación de esta vía es lo que impide el aumento de MDA en los HeJ.

Un dato interesante que confirma un papel clave de TLR-4 en el estado inflamatorio de la corteza prefrontal tras estrés es la regulación del receptor antiinflamatorio PPAR γ , un factor de transcripción activado dependiente de ligando, su principal ligando endógeno es la prostaglandina 15-deoxi-Prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂). La exposición a estrés disminuye el mRNA de PPAR γ en corteza prefrontal de los ratones HeN, pero no de los HeJ, que además presentan un aumento de la traslocación del receptor PPAR γ al núcleo. Estos resultados son coherentes con estudios previos que muestran una relación entre LPS/TLR-4 y 15d-PGJ₂/PPAR γ en situaciones de inflamación como daño pulmonar inducido por LPS o enfermedad inflamatoria intestinal (Inoue et al., 2005; Rousseaux y Desreumaux, 2006; Pirianov et al., 2009). La relación entre estos dos sistemas se da también a nivel celular en macrófagos y otras células inmunes (Inoue et al., 2000; Dasu et al., 2009).

Los animales que han consumido antibiótico no presentan la activación de la vía de NF- κ B, ni de sus productos iNOS y COX-2 que se inducen con el estrés. Estos resultados indican que la activación de la vía proinflamatoria de NF- κ B tras estrés se debe, al menos en parte, a la activación del TLR-4, y que el receptor se estimula por las bacterias o el LPS de las mismas, de origen intestinal.

La relación de TLR-4 y el eje HPA es compleja, como vimos en el apartado anterior. Aunque los animales con la mutación presentan niveles altos de corticosterona tras el estrés, estos niveles no varían entre los ratones HeJ con y sin estrés. Esto se debe a que en situación basal, los niveles de corticosterona de los animales con la mutación son mayores que en los WT, aunque no de manera significativa. Otros estudios con animales transgénicos, *knock-out* para el receptor TLR-4, han puesto en evidencia alteraciones en la estructura de las glándulas adrenales, que están hipertrofiadas, y en los niveles basales de corticosterona, que

están aumentados (Zacharowski et al., 2006). En situación basal, cuando el receptor TLR-4 no funciona con normalidad, parece existir un mecanismo compensatorio para mantener los niveles de corticosterona plasmática.

En resumen, los datos de este estudio indican un papel crucial de la vía del TLR-4 en la neuroinflamación de la corteza prefrontal inducida por estrés y en la traslocación bacteriana intestinal. Los resultados de la descontaminación intestinal confirman la implicación de la traslocación bacteriana intestinal en la activación de la vía del TLR-4 sugiriendo la importancia de la permeabilidad intestinal (leaky gut) en la fisiopatología de enfermedades como la depresión. El potencial terapéutico de esta vía requiere estudios más concretos.

3. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TLR-4 EN CEREBRO TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS: IMPLICACIONES TRASLACIONALES

Los resultados de este estudio confirman el papel de la traslocación bacteriana intestinal y la subsiguiente activación de la vía TLR-4 en un modelo experimental de depresión. Este trabajo es pionero, ya que no tenemos constancia de estudios previos que demuestren la activación de TLR-4 en la corteza prefrontal en un modelo ampliamente utilizado con fines traslacionales. En nuestro estudio, tras *Chronic Mild Stress* (CMS) la activación de TLR-4 coincide con el aumento de los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β y de las enzimas iNOS y COX-2, responsables de la producción de mediadores inflamatorios y oxidativos. Resulta interesante comprobar cómo se rompe el balance pro/antiinflamatorio, ya que no sólo aumenta la prostaglandina proinflamatoria PGE₂, sino que la PG antiinflamatoria 15d-PGJ₂ está disminuida tras CMS. Una posible consecuencia de este aumento de la inflamación y oxidación en la corteza prefrontal es un incremento de la peroxidación lipídica.

Los experimentos de descontaminación intestinal con antibiótico sugieren un papel crucial de la traslocación intestinal de las bacterias Gram-negativas en la activación de la vía del TLR-4 y en la neuroinflamación en la corteza prefrontal tras la exposición a 21 días de CMS.

Al igual que en los protocolos más agudos de estrés utilizados en esta Tesis, los resultados confirman que el protocolo de CMS aumenta la expresión del complejo TLR-4/MD-2, indicando una activación de esta vía en dicho modelo de depresión. Este aumento podría deberse al aumento de LBP/LPS que se observa en plasma. Como

sucede en modelos de estrés agudo y subcrónico (Demaude et al., 2006; Ponferrada et al., 2007), el CMS parece aumentar la permeabilidad intestinal. Además, en pacientes con depresión se han encontrado pruebas de traslocación bacteriana intestinal que podría contribuir a la fisiopatología de esta enfermedad (Maes et al., 2008).

De acuerdo con otros estudios de estrés experimental, incluido el CMS, nuestros datos muestran que el CMS induce un daño inflamatorio y oxidativo en la corteza prefrontal (García-Bueno et al., 2008; Kubera et al., 2011; Tagliari et al., 2011). En concreto, el aumento del mRNA de IL-1 β en la corteza prefrontal coincide con lo observado en otros estudios en los que la exposición a estrés aumenta los niveles de esta citoquina proinflamatoria en el hipocampo (Minami et al., 1991; Deak et al., 2005). Este dato es importante pues la IL-1 β juega un papel importante en el comportamiento, se trata de la citoquina principalmente responsable del llamado *sickness behaviour* que se observa tras una inyección de LPS (el LPS induce la liberación de IL-1 β) (Goshen et al., 2008). De hecho, algunos investigadores la consideran en parte responsable de la fisiopatología de la depresión, ya que entre sus síntomas aparecen anorexia, anhedonia, etc (Lucas et al., 2006; Dantzer et al., 2008). Además las acciones de IL-1 β en el SNC incluyen la producción de otras citoquinas proinflamatorias que pueden activar la secreción de mediadores oxidativos e inflamatorios.

Aparte de la IL-1 β , otros mediadores como la COX-2 y su principal producto en el SNC, la PG proinflamatoria PGE₂, están aumentadas después de 21 días de CMS. Ambos mediadores se inducen en macrófagos con ligandos del TLR-4 (Norris et al., 2011). En corteza prefrontal, la activación de la COX-2 por estrés agudo está demostrada (Madrigal et al., 2003c), y su aumento se considera un fenómeno importante en las patologías que afectan al SNC (Phillis et al., 2006). Por otro lado, la PGE₂ estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, la expresión de COX-2 y la actividad de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) cuya actividad reduce los niveles de serotonina, hecho característico de la fisiopatología de la depresión (Muller y Schwarz, 2007). Otro resultado interesante en relación a la COX-2, es que otro de sus productos, la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ₂, está disminuida, así que en el CMS, no sólo se induce la producción de mediadores proinflamatorios, sino que se reducen los mecanismos compensatorios, es decir que el CMS rompe el equilibrio entre mediadores pro y antiinflamatorios. Este es un dato que debe considerarse de especial importancia dado el interés traslacional del modelo.

Se ha descrito que durante la producción de PG, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que son responsables de causar daño oxidativo/nitrosativo en distintas áreas cerebrales, entre ellas el hipocampo, en protocolos de estrés crónico (Zhou et al., 2007), como ocurre en corteza prefrontal en el CMS de 21 días llevado a cabo, donde se encuentra aumentado el MDA, marcador que indica peroxidación lipídica.

La enzima iNOS se encuentra aumentada en corteza prefrontal en protocolos de estrés agudo en roedores (Olivenza et al., 2000). Sin embargo, en el CMS no se observa el aumento de iNOS tras 21 días, este dato coincide con otros estudios que implican a la isoforma neuronal de NOS en el daño oxidativo (Zhou et al., 2007).

Nuestros datos sugieren que la peroxidación lipídica observada en este caso, se debe principalmente a los productos derivados de la COX-2 y a la ruptura del equilibrio proinflamatorio/antiinflamatorio.

La activación del factor nuclear NF- κ B se ha observado en protocolos de estrés agudo y controla la activación de diversas proteínas de fase aguda y de genes proinflamatorios (Madrigal et al., 2001a). Como se ha explicado, su actividad está bloqueada por la proteína inhibidora I κ B α que impide su traslocación al núcleo, cuando la vía se activa, I κ B α se degrada permitiendo que NF- κ B llegue al núcleo celular donde promueve la transcripción de genes de proteínas proinflamatorias. Sin embargo después de 21 días de CMS la subunidad p65 de este factor de transcripción está disminuida y su proteína inhibidora aumentada. Como ocurre en otros estudios el aumento del mRNA de I κ B α es un mecanismo autoregulator en casos de una estimulación prolongada de NF- κ B como podría ser el caso en el CMS (Sun et al., 1993; 1994).

Los resultados discutidos hasta ahora sugieren que el receptor TLR-4 podría ser un factor regulador de la neuroinflamación observada en corteza prefrontal también después de 21 días de CMS.

A continuación se quiso esclarecer el origen de la activación del TLR-4 en el CMS. Basándonos en estudios de permeabilidad intestinal tras estrés (Demaude et al., 2006; Ponferrada et al., 2007) y en el aumento observado de la proteína de unión al LPS, la LBP y del mismo LPS en plasma en el protocolo de CMS, realizamos un protocolo de descontaminación intestinal durante las tres semanas de estrés. Como cuestión previa, los antibióticos administrados en la bebida no tienen efectos neuroprotectores o antiinflamatorios en el SNC, (Ando et al., 2000; Caso et al., 2009) lo que nos permite analizar únicamente los efectos de la descontaminación intestinal

para confirmar el papel de la traslocación bacteriana intestinal en la estimulación de la vía del TLR-4 en el CMS.

En primer lugar, la expresión del complejo TLR-4/MD-2 en corteza prefrontal no aumenta en los animales que recibieron el antibiótico, del mismo modo que la LBP y el LPS muestran los mismos niveles en los animales control que los que recibieron antibiótico durante el CMS. Estos resultados indican que el antibiótico está bloqueando el aumento de LBP/LPS en la circulación, lo que sugiere que el LPS provenía de las bacterias intestinales. Podemos deducir que al darse una disminución del ligando de TLR-4/MD-2, el receptor no aumenta su expresión. Esto es un hecho a favor de que la activación de TLR-4 esté mediada por las bacterias intestinales o bien por subproductos como puede ser el LPS.

Se estudió también cómo afecta la descontaminación intestinal a los mediadores inflamatorios y oxidativos/nitrosativos analizados anteriormente. Los resultados más importantes son la disminución de IL-1 β y COX-2/PGE₂ en la corteza prefrontal de los animales que reciben tratamiento antibiótico, lo que apoya la idea de que el LPS de las bacterias traslocadas estimula el TLR-4 produciendo una activación de la vía proinflamatoria subsiguiente. El dato más interesante es la capacidad del tratamiento de restaurar el equilibrio entre las prostaglandinas pro y antiinflamatorias derivadas de COX (PGE₂ y 15d-PGJ₂).

Por último se estudiaron los niveles plasmáticos de corticosterona, que se encuentran elevados en los animales sometidos a CMS, de manera que, después de 21 días los animales permanecen con el eje HPA activado. Sin embargo, los sujetos que reciben tratamiento antibiótico, presentan niveles equiparables a los de los animales control. Como se ha comentado en apartados anteriores, la estimulación de TLR-4 por LPS está relacionada con la secreción de corticosterona y la activación del eje HPA (Dunn et al., 2003). Es posible que parte de la activación del eje HPA observada se deba a las bacterias traslocadas y no únicamente a los agentes estresantes.

Los efectos de la descontaminación intestinal en el comportamiento tipo depresivo en las ratas, se midieron con el test de natación forzada descrito por Porsolt (1977). Pese a sus efectos antiinflamatorios, los antibióticos no revierten los efectos comportamentales inducidos por el CMS, lo que sugiere que el LPS no tiene consecuencias comportamentales en este caso, aunque no se puede descartar un posible efecto en otros.

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que en este modelo de depresión se produce traslocación bacteriana intestinal y que el LPS proveniente de las bacterias intestinales es responsable de la activación de TLR-4, lo que desencadena un aumento de mediadores proinflamatorios en corteza prefrontal después de 21 días de CMS. De hecho, se observa una disminución del LPS y de la inflamación en el cerebro con la descontaminación intestinal. El potencial terapéutico de esta diana reside en su capacidad para disminuir parámetros inflamatorios en el SNC, pues la neuroinflamación se considera un factor de riesgo mayor que el estrés psicosocial en el desarrollo de la depresión mayor (Dantzer et al., 2008).

4. DISCUSIÓN GLOBAL

En los tres estudios realizados se observa una relación entre TLR-4 y los niveles de corticosterona, lo que sugiere un papel importante de TLR-4 en la respuesta endocrina. Como se ha comentado, este receptor se encuentra en la glándulas adrenales y su activación induce la secreción de glucocorticoides (Vakharia y Hinson, 2005; Martínez Calejman et al., 2011). Es posible que parte del aumento de corticosterona observado en los animales con el TLR-4 normal y sin ningún tratamiento se deba no sólo al estrés, sino a la activación de los receptores TLR-4 adrenales por el LPS de las bacterias que se han traslocado. Por este motivo, al inhibirse la traslocación o al bloquearse el TLR-4 farmacológicamente (TAK-242) se observa una disminución de corticosterona plasmática al prolongarse la exposición al estrés. Esta vuelta a niveles basales podría deberse al efecto del *feedback* negativo de los GC sobre el eje HPA.

Como se ha descrito anteriormente, existen estudios que demuestran que la expresión de TLR-4 puede estar regulada por diversos mediadores relacionados con la respuesta al estrés. Como es el caso de las proteínas de choque térmico (HSP) del glutamato y de la adrenalina o la noradrenalina (Tsan y Gao, 2004; Glezer et al., 2003; Kizaki et al., 2008; Du et al., 2012). En este estudio, la expresión de TLR-4 aumenta en todos los protocolos de estrés.

Además, se ha visto que tanto los animales que tienen el TLR-4 bloqueado (TAK-242 o HeJ) como los que han sido sometidos a protocolos de descontaminación intestinal dejan de presentar el aumento que induce el estrés en corteza prefrontal. Estos datos indican que el aumento de expresión de TLR-4 inducido por estrés se da únicamente cuando hay activación del receptor. Si este receptor no se activa, bien por

que está bloqueado, porque no es funcional o porque el ligando (LPS) no está presente, no se produce el aumento de la expresión. Se trataría de una autorregulación de la expresión.

Durante los últimos años, se ha puesto en evidencia el papel de los TLRs en la fisiopatología de diversas enfermedades neurológicas (Crack y Bray, 2007; Hanke y Kielian, 2011), como la esclerosis múltiple (Prinz et al., 2006), la enfermedad de Alzheimer (Tahara et al., 2006) o la isquemia cerebral (Caso et al., 2007; Wang et al., 2011). Los resultados de este estudio presentan la posibilidad de que el TLR-4 sea un importante regulador de la respuesta fisiológica al estrés y de su posible manipulación farmacológica para minimizar el daño inflamatorio en la corteza prefrontal inducido por estrés, y por patologías relacionadas con el estrés como la depresión.

Sin embargo, no hay que olvidar que los TLRs constituyen una familia de receptores inmunes, que forman parte de la primera línea de defensa del organismo frente a patógenos. El hecho de estar altamente conservados demuestra que su función es importante y adaptativa para la supervivencia de los organismos. Se ha visto que están involucrados en múltiples procesos como la restauración de la homeostasis en el SNC después de un daño (Griffiths et al., 2010), o la resolución apropiada de los procesos inflamatorios (Kigerl et al., 2007). De hecho, en este estudio, los animales transgénicos con el TLR-4 no funcional presentan, después del estrés, un aumento de la traslocación bacteriana intestinal, más LPS en plasma y menor protección a nivel gastrointestinal. Estos resultados indican que la relación entre TLR-4 y traslocación bacteriana se da en los dos sentidos, por un lado TLR-4 regula la traslocación bacteriana intestinal, y por otro las bacterias traslocadas activan TLR-4. Estos datos apuntarían a un papel del TLR-4 en el eje “digestivo-cerebro” conocido en inglés como *Gut-Brain axis*, que consiste en una comunicación bidireccional entre los dos sistemas, el nervioso y el gastrointestinal.

Los datos aportados por la serie de experimentos realizados en esta Tesis muestran una serie de procesos comunes inducidos por estrés agudo y que se mantienen al cronificarse el estrés: traslocación bacteriana intestinal, activación de la vía de TLR-4 y neuroinflamación. En este sentido es interesante ver que un dato más que confirma la relación entre estrés y depresión. Teniendo en cuenta que más del 85% de los pacientes con depresión han experimentado un estrés importante antes de la aparición de sus síntomas depresivos (Parker et al., 2003) es posible que los procesos mencionados estén implicados, lo que explicaría la traslocación bacteriana en pacientes con depresión (Maes et al., 2008).

El bloqueo de TLR-4 y la descontaminación intestinal muestran un potencial terapéutico en la regulación de la inflamación en el cerebro inducida por estrés. Son especialmente interesantes los datos aportados por el modelo de depresión, una enfermedad que afecta a 121 millones de personas en el mundo y la OMS estima que será la primera causa de invalidez (AVAD) en el 2030, y sin embargo los tratamientos que existen no son eficaces en un tercio de los casos, lo que precisa investigación sobre posibles cotratamientos que aumenten la eficacia de los actuales.

Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar si el bloqueo de TLR-4 aportaría neuroprotección en caso de neuroinflamación crónica o si por el contrario impediría la resolución de estos procesos. En este sentido, un estudio interesante muestra en un modelo de estrés crónico un papel importante de TLR-4 en la supresión inmune inducida por estrés a través de un cambio de expresión en las citoquinas de los linfocitos Th1/Th2 (Zhang et al., 2008). No obstante el bloqueo de los TLRs podría conllevar una respuesta inmune “inapropiada”, del tipo de respuesta alérgica mediada por Th2 o desarrollo de tolerancias inmunológicas (Ishii et al., 2006) lo que demuestra la necesidad de más estudios que mejoren el conocimiento de la vía de TLR-4.

En conclusión, teniendo en cuenta el conjunto de los datos, tanto la traslocación bacteriana intestinal, como la activación subsiguiente del TLR-4 parecen ser claves en la respuesta al estrés. Por este motivo, debe considerarse que se trata de posibles dianas farmacológicas en patologías relacionadas con el estrés y que presenten un incremento de la permeabilidad intestinal (*leaky gut*), como la depresión.

V. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES

1. La exposición a diversos protocolos de estrés activa la vía del receptor Toll-like 4 en el cerebro de roedor. La expresión de TLR-4 aumenta en estrés agudo, sub-crónico y crónico, mientras que su correceptor MD-2 sólo en protocolos de exposición repetida a estrés.
2. La exposición a estrés, tanto aguda como crónica, induce traslocación bacteriana intestinal en rata, con un aumento del lipopolisacárido de la pared bacteriana en plasma. Las bacterias de la flora gastrointestinal que han traslocado a través de la barrera intestinal, o bien elementos de su estructura, participan en la activación del receptor Toll-like 4 en la corteza prefrontal.
3. La exposición a estímulos estresantes induce un aumento de mediadores oxidativos/nitrosativos e inflamatorios, en la corteza prefrontal de rata y ratón, que está mediado, en parte, por el receptor Toll-like 4.
4. La exposición repetida a estrés en roedores inhibe mecanismos antiinflamatorios en la corteza prefrontal, y el receptor Toll-like 4 participa en esta inhibición.
5. La secreción de corticosterona en protocolos de estrés que producen traslocación bacteriana intestinal se debe en parte a la activación del receptor Toll-like 4.

Todas estas conclusiones se resumen en la Figura 53.

2. CONCLUSIONS

1. Stress exposure activates the Toll-like receptor 4 pathway in rat/mouse brain.
2. Exposure to stressful stimuli induces an increase of oxidative/nitrosative and inflammatory mediators in prefrontal cortex of rats and mice mediated, at least in part, by Toll-like receptor 4.
3. In rats/mice repeated exposure to stress inhibits antiinflammatory mechanisms in prefrontal cortex mediated, at least in part, by Toll-like receptor 4.

4. Acute and chronic stress exposure induce bacterial translocation in rat, as well as an increase of lipopolysaccharide in plasma. After entering the organism, the intestinal microbiota activates the Toll-like receptor 4 pathway in the prefrontal cortex.

5. Corticosterone secretion in stress protocols with bacterial translocation, is in part due to the activation of Toll-like receptor 4.

All of these conclusions appear in the following figure.

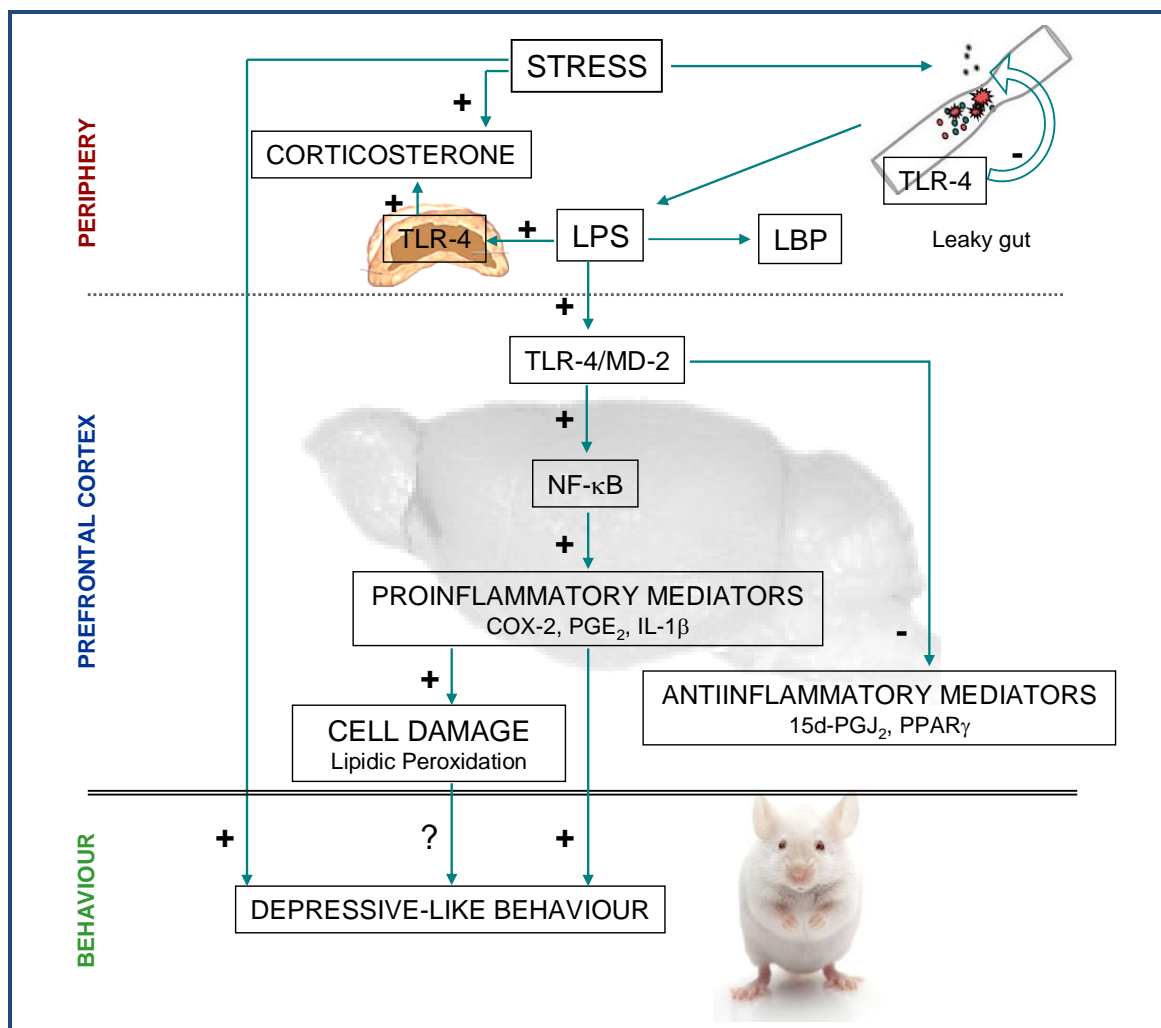


Figura 53. Representación esquemática de las conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Halim MS, Anggard E (1979) Regional and species differences in endogenous prostaglandin biosynthesis by brain homogenates. *Prostaglandins* 17:411-418.
- Abercrombie ED, Jacobs BL (1987) Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli. *J Neurosci* 7:2837-2843.
- Abraham I, Veenema AH, Nyakas C, Harkany T, Bohus BG, Luiten PG (1997) Effect of corticosterone and adrenalectomy on NMDA-induced cholinergic cell death in rat magnocellular nucleus basalis. *J Neuroendocrinol* 9:713-720.
- Ackerman KD, Martino M, Heyman R, Moyna NM, Rabin BS (1998) Stressor-induced alteration of cytokine production in multiple sclerosis patients and controls. *Psychosom Med* 60:484-491.
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9:143-150.
- Aggleton JP, Kentridge RW, Sembi S (1992) Lesions of the fornix but not the amygdala impair the acquisition of concurrent discriminations by rats. *Behav Brain Res* 48:103-112.
- Aisen PS, Davis KL, Berg JD, Schafer K, Campbell K, Thomas RG, Weiner MF, Farlow MR, Sano M, Grundman M, Thal LJ (2000) A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Neurology* 54:588-593.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Alexis M, Stylianopoulou F, Kitraki E, Manz B (1982) Glucocorticoid receptors in rat brain and pituitary. *Prog Clin Biol Res* 102 pt A:207-217.
- Allan SM, Rothwell NJ (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:1669-1677.
- Allsworth JE, Clarke J, Peipert JF, Hebert MR, Cooper A, Boardman LA (2007) The influence of stress on the menstrual cycle among newly incarcerated women. *Womens Health Issues* 17:202-209.
- American Psychiatric Association (1994) DSM IV- diagnostic and statistical manual of psychiatric disorders.
- Ando T, Brown RF, Berg RD, Dunn AJ (2000) Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2164-R2172.
- Angelucci L (2000) The glucocorticoid hormone: from pedestal to dust and back. *Eur J Pharmacol* 405:139-147.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T (1994) Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 302 (Pt 3):723-727.
- Araujo AB, Durante R, Feldman HA, Goldstein I, McKinlay JB (1998) The relationship between depressive symptoms and male erectile dysfunction: cross-sectional results from the Massachusetts Male Aging Study. *Psychosom Med* 60:458-465.
- Axelrod J, Reisine TD (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224:452-459.

- Baker DG, West SA, Nicholson WE, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, Bruce AB, Orth DN, Geraciotti TD, Jr. (1999) Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 156:585-588.
- Baldwin AS (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
- Bartolomucci A (2005) Resource loss and stress-related disease: is there a link? *Med Sci Monit* 11:RA147-RA154.
- Baum A, Posluszny DM (1999) Health psychology: mapping biobehavioral contributions to health and illness. *Annu Rev Psychol* 50:137-163.
- Bazzoni F, Beutler B (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725.
- Bennett EJ, Piesse C, Palmer K, Badcock CA, Tennant CC, Kellow JE (1998) Functional gastrointestinal disorders: psychological, social, and somatic features. *Gut* 42:414-420.
- Berga SL (1996) Stress and ovarian function. *Am J Sports Med* 24:S36-S37.
- Beutler B, Rietschel ET (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3:169-176.
- Bhargava A, Meijer OC, Dallman MF, Pearce D (2000) Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. *J Neurosci* 20:3129-3138.
- Bierhaus A, Nawroth PP (2003) Modulation of the vascular endothelium during infection--the role of NF-kappa B activation. *Contrib Microbiol* 10:86-105.
- Bishai I, Coceani F (1992) Eicosanoid formation in the rat cerebral cortex. Contribution of neurons and glia. *Mol Chem Neuropathol* 17:219-238.
- Black PH, Garbutt LD (2002) Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res* 52:1-23.
- Block ML, Hong JS (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* 35:1127-1132.
- Bornstein SR, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Zacharowski K (2004) Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals. *Horm Metab Res* 36:470-473.
- Bower JE, Ganz PA, Aziz N, Fahey JL (2002) Fatigue and proinflammatory cytokine activity in breast cancer survivors. *Psychosom Med* 64:604-611.
- Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS (1997) Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 154:624-629.
- Buckley TC, Blanchard EB, Neill WT (2000) Information processing and PTSD: a review of the empirical literature. *Clin Psychol Rev* 20:1041-1065.
- Busbridge NJ, Grossman AB (1991) Stress and the single cytokine: interleukin modulation of the pituitary-adrenal axis. *Mol Cell Endocrinol* 82:C209-C214.
- Butterweck V, Prinz S, Schwaninger M (2003) The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behav Brain Res* 144:49-56.

- Buynitsky T, Mostofsky DI (2009) Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1089-1098.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383:443-446.
- Capuron L, Ravaud A (1999) Prediction of the depressive effects of interferon alfa therapy by the patient's initial affective state. *N Engl J Med* 340:1370.
- Capuron L, Ravaud A, Dantzer R (2000) Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *J Clin Oncol* 18:2143-2151.
- Capuron L, Gumnick JF, Musselman DL, Lawson DH, Reemsnyder A, Nemeroff CB, Miller AH (2002) Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology* 26:643-652.
- Capuron L, Raison CL, Musselman DL, Lawson DH, Nemeroff CB, Miller AH (2003) Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon-alpha with development of depression during interferon-alpha therapy. *Am J Psychiatry* 160:1342-1345.
- Carroll BJ, Curtis GC, Davies BM, Mendels J, Sugerman AA (1976) Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med* 6:43-50.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Moro MA, Lizasoain I (2008) Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke* 39:1314-1320.
- Caso JR, Hurtado O, Pereira MP, Garcia-Bueno B, Menchen L, Alou L, Gomez-Lus ML, Moro MA, Lizasoain I, Leza JC (2009) Colonic bacterial translocation as a possible factor in stress-worsening experimental stroke outcome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R979-R985.
- Chaniotou Z, Giannogonas P, Theoharis S, Teli T, Gay J, Savidge T, Koutmani Y, Brugni J, Kokkotou E, Pothoulakis C, Karalis KP (2010) Corticotropin-releasing factor regulates TLR4 expression in the colon and protects mice from colitis. *Gastroenterology* 139:2083-2092.
- Charney DS, Deutch AY, Krystal JH, Southwick SM, Davis M (1993) Psychobiologic mechanisms of posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 50:295-305.
- Choi DW (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58:293-297.
- Christiansen S, Bouzinova EV, Palme R, Wiborg O (2012) Circadian activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is differentially affected in the rat chronic mild stress model of depression. *Stress*.
- Chuang TH, Ulevitch RJ (2004) Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 5:495-502.
- Constant A, Castera L, Dantzer R, Couzigou P, de L, V, Demotes-Mainard J, Henry C (2005) Mood alterations during interferon-alfa therapy in patients with chronic hepatitis C: evidence for an overlap between manic/hypomanic and depressive symptoms. *J Clin Psychiatry* 66:1050-1057.

- Corradetti R, Ballerini L, Pugliese AM, Pepeu G (1992) Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* 46:511-518.
- Crack PJ, Bray PJ (2007) Toll-like receptors in the brain and their potential roles in neuropathology. *Immunol Cell Biol* 85:476-480.
- D'Aquila PS, Brain P, Willner P (1994) Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav* 56:861-867.
- Da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276:21129-21135.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46-56.
- Das NP, Ratty AK (1987) Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, and codeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 37:258-264.
- Dasu MR, Park S, Devaraj S, Jialal I (2009) Pioglitazone inhibits Toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice. *Endocrinology* 150:3457-3464.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G (2000) Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3919-3924.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24:488-522.
- De Cristóbal J, Moro MA, Davalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I (2001) Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 79:456-459.
- Deak T, Bordner KA, McElderry NK, Barnum CJ, Blandino P, Jr., Deak MM, Tammariello SP (2005) Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. *Brain Res Bull* 64:541-556.
- Delaney JR, Stoven S, Uvell H, Anderson KV, Engstrom Y, Mlodzik M (2006) Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *EMBO J* 25:3068-3077.
- Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L (2006) Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55:655-661.
- DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC (2002) Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 34:385-396.
- Denicoff KD, Rubinow DR, Papa MZ, Simpson C, Seipp CA, Lotze MT, Chang AE, Rosenstein D, Rosenberg SA (1987) The neuropsychiatric effects of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Ann Intern Med* 107:293-300.
- Depke M, Fusch G, Domanska G, Geffers R, Volker U, Schuett C, Kiank C (2008) Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology* 149:2714-2723.

- Dhir A, Padi SS, Naidu PS, Kulkarni SK (2006) Protective effect of naproxen (non-selective COX-inhibitor) or rofecoxib (selective COX-2 inhibitor) on immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations in mice. *Eur J Pharmacol* 535:192-198.
- Dinareello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139:1902-1910.
- Dinareello CA (1994) Interleukin-1 antagonists. *J Interferon Res* 14:307.
- Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, Finberg RW, Tarakhovsky A, Vogel SN, Belkaid Y, Kurt-Jones EA, Karp CL (2005) Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 6:571-578.
- Dodt C, Dittmann J, Hruby J, Spath-Schwalbe E, Born J, Schuttler R, Fehm HL (1991) Different regulation of adrenocorticotropin and cortisol secretion in young, mentally healthy elderly and patients with senile dementia of Alzheimer's type. *J Clin Endocrinol Metab* 72:272-276.
- Du Q, Min S, Chen LY, Ma YD, Guo XL, Wang Z, Wang ZG (2012) Major Stress Hormones Suppress the Response of Macrophages Through Down-Regulation of TLR2 and TLR4. *J Surg Res* 173:354-361.
- Dunn AJ, Ando T, Brown RF, Berg RD (2003) HPA axis activation and neurochemical responses to bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 992:21-29.
- Dunn AJ, Berridge CW (1990) Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann N Y Acad Sci* 579:183-191.
- Dunn AJ, Wang J, Ando T (1999) Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol* 461:117-127.
- Egan RW, Paxton J, Kuehl FA, Jr. (1976) Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J Biol Chem* 251:7329-7335.
- Ellard K, Beaurepaire J, Jones M, Piper D, Tennant C (1990) Acute and chronic stress in duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 99:1628-1632.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H (2002a) Stress in cardiovascular diseases. *Med Sci Monit* 8:RA93-RA101.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H (2002b) Stress-related diseases -- a potential role for nitric oxide. *Med Sci Monit* 8:RA103-RA118.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H (2002c) The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuro Endocrinol Lett* 23:199-208.
- Fang CW, Yao YM, Zhai HX, Yu Y, Wu Y, Lu LR, Sheng ZY, Sheng CY (2004) Tissue lipopolysaccharide-binding protein expression in rats after thermal injury: potential role of TNF- α . *Burns* 30:225-231.
- Farooq RK, Isingrini E, Tanti A, Le Guisquet AM, Arlicot N, Minier F, Leman S, Chalon S, Belzung C, Camus V (2012) Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res* 231:130-137.
- Feinstein DL (2003) Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes Technol Ther* 5:67-73.
- Fenster L, Waller K, Chen J, Hubbard AE, Windham GC, Elkin E, Swan S (1999) Psychological stress in the workplace and menstrual function. *Am J Epidemiol* 149:127-134.

- Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L (2003) Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125:795-804.
- Flint MS, Morgan JB, Shreve SN, Tinkle SS (2003) Restraint stress and corticotropin releasing hormone modulation of murine cutaneous POMC mRNA. *Stress* 6:59-62.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812.
- Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF (2010) Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 24:19-30.
- Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100:171-194.
- Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Ardit M, Abreu MT (2005) Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G1055-G1065.
- Gallucci S, Matzinger P (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:114-119.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC (2005a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry* 57:885-894.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC (2005b) The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 180:513-522.
- García-Bueno B, Caso JR, Leza JC (2008) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1136-1151.
- García-Bueno B, Leza J (2008) Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposición a estrés. pp 675-683.
- García-Bueno B, Serrats J, Sawchenko PE (2009) Cerebrovascular cyclooxygenase-1 expression, regulation, and role in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by inflammatory stimuli. *J Neurosci* 29:12970-12981.
- Garvey WT, Huecksteadt TP, Lima FB, Birnbaum MJ (1989) Expression of a glucose transporter gene cloned from brain in cellular models of insulin resistance: dexamethasone decreases transporter mRNA in primary cultured adipocytes. *Mol Endocrinol* 3:1132-1141.
- Gibbons JL, McHugh PR (1962) Plasma cortisol in depressive illness. *J Psychiatr Res* 1:162-171.
- Gilad GM, Gilad VH (1995) Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech Ageing Dev* 78:75-83.
- Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 5:698-701.
- Glezer I, Zekki H, Scavone C, Rivest S (2003) Modulation of the innate immune response by NMDA receptors has neuropathological consequences. *J Neurosci* 23:11094-11103.

- Gold PW, Calabrese JR, Kling MA, Avgerinos P, Khan I, Gallucci WT, Tomai TP, Chrousos GP (1986) Abnormal ACTH and cortisol responses to ovine corticotropin releasing factor in patients with primary affective disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10:57-65.
- Goldman-Rakic PS (1987) Motor control function of the prefrontal cortex. *Ciba Found Symp* 132:187-200.
- Goldstein DS (1995) Clinical assessment of sympathetic responses to stress. *Ann N Y Acad Sci* 771:570-593.
- Goldstein DS, McEwen B (2002) Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 5:55-58.
- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844.
- Gorka Z, Moryl E, Papp M (1996) Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 54:229-234.
- Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R (2008) Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 13:717-728.
- Gosselin D, Rivest S (2008) MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation. *Mol Psychiatry* 13:480-497.
- Gourley SL, Taylor JR (2009) Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9:Unit*.
- Griffiths MR, Gasque P, Neal JW (2010) The regulation of the CNS innate immune response is vital for the restoration of tissue homeostasis (repair) after acute brain injury: a brief review. *Int J Inflam* 2010:151097.
- Grippe AJ, Francis J, Beltz TG, Felder RB, Johnson AK (2005) Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav* 84:697-706.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179:269-277.
- Hamner MB, Gold PB (1998) Plasma dopamine beta-hydroxylase activity in psychotic and non-psychotic post-traumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 77:175-181.
- Hanke ML, Kielian T (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 121:367-387.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
- Heesen C, Gold SM, Raji A, Wiedemann K, Schulz KH (2002) Cognitive impairment correlates with hypothalamo-pituitary-adrenal axis dysregulation in multiple sclerosis. *Psychoneuroendocrinology* 27:505-517.
- Herbert TB, Cohen S (1993a) Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull* 113:472-486.

- Herbert TB, Cohen S (1993b) Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med* 55:364-379.
- Hoffman SW, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Ellis EF (2000) Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *J Neurotrauma* 17:415-420.
- Holden RJ, Pakula IS (1999) Tumor necrosis factor-alpha: is there a continuum of liability between stress, anxiety states and anorexia nervosa? *Med Hypotheses* 52:155-162.
- Horner HC, Munck A, Lienhard GE (1987) Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J Biol Chem* 262:17696-17702.
- Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol* 22:1-23.
- Ii M, Matsunaga N, Hazeki K, Nakamura K, Takashima K, Seya T, Hazeki O, Kitazaki T, Iizawa Y (2006) A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol* 69:1288-1295.
- Inoue H, Tanabe T, Umesono K (2000) Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 275:28028-28032.
- Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Uchiyama K, Yoshikawa T (2005) Effects of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 on the expression of Toll-like receptor 4 and 2 in the murine lung in the presence of lipopolysaccharide. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:230-232.
- Ishii KJ, Uematsu S, Akira S (2006) 'Toll' gates for future immunotherapy. *Curr Pharm Des* 12:4135-4142.
- Iyer AM, Brooke SM, Sapolsky RM (1998) Glucocorticoids interact with gp120 in causing neurotoxicity in striatal cultures. *Brain Res* 808:305-309.
- Jabaudon D, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (2000) Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5610-5615.
- Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Füll B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schütt C (1997) Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 389:742-745.
- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O (2006) Hippocampal cytochrome correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 31:2395-2404.
- Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82-86.
- Joseph MH, Kennett GA (1983) Stress-induced release of 5-HT in the hippocampus and its dependence on increased tryptophan availability: an in vivo electrochemical study. *Brain Res* 270:251-257.
- Jou I, Lee JH, Park SY, Yoon HJ, Joe EH, Park EJ (2006) Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol* 168:1619-1630.
- Kalin NH, Weiler SJ, Shelton SE (1982) Plasma ACTH and cortisol concentrations before and after dexamethasone. *Psychiatry Res* 7:87-92.

- Kawamoto T, Li M, Kitazaki T, Iizawa Y, Kimura H (2008) TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol* 584:40-48.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156:837-841.
- Kiank C, Holtfreter B, Starke A, Mundt A, Wilke C, Schutt C (2006) Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun* 20:359-368.
- Kigerl KA, Lai W, Rivest S, Hart RP, Satoskar AR, Popovich PG (2007) Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem* 102:37-50.
- Kirschning C, Unbehauen A, Lamping N, Pfeil D, Herrmann F, Schumann RR (1997) Control of transcriptional activation of the lipopolysaccharide binding protein (LBP) gene by proinflammatory cytokines. *Cytokines Cell Mol Ther* 3:59-62.
- Kizaki T, Iizawa T, Sakurai T, Haga S, Taniguchi N, Tajiri H, Watanabe K, Day NK, Toba K, Ohno H (2008) Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappaB activation through beta-arrestin 2. *Immunology* 124:348-356.
- Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, Russell DS, D'Sa C (2008) Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology* 33:1545-1558.
- Kremen WS, Koenen KC, Afari N, Lyons MJ (2012) Twin studies of posttraumatic stress disorder: differentiating vulnerability factors from sequelae. *Neuropharmacology* 62:647-653.
- Kronfol Z, Remick DG (2000) Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry* 157:683-694.
- Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M (2011) In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:744-759.
- Lacosta S, Merali Z, Anisman H (1999) Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res* 818:291-303.
- Lacroix S, Feinstein D, Rivest S (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* 8:625-640.
- Laflamme N, Rivest S (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15:155-163.
- Larson MR, Ader R, Moynihan JA (2001) Heart rate, neuroendocrine, and immunological reactivity in response to an acute laboratory stressor. *Psychosom Med* 63:493-501.
- Lauterborn JC (2004) Stress induced changes in cortical and hypothalamic c-fos expression are altered in fragile X mutant mice. *Brain Res Mol Brain Res* 131:101-109.
- Lawrence MS, Sapolsky RM (1994) Glucocorticoids accelerate ATP loss following metabolic insults in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 646:303-306.

- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22:2478-2486.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8514-8519.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Lesperance F, Frasure-Smith N, Theroux P, Irwin M (2004) The association between major depression and levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, interleukin-6, and C-reactive protein in patients with recent acute coronary syndromes. *Am J Psychiatry* 161:271-277.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A (2000) Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 95:1213-1220.
- Levine S, Ursin H, (1991) What is stress? In: *Stress Neurobiology and Neuroendocrinology* (Brown MR, Koob GF, eds), pp 3-21. New York: Rivier Marcel Dekker.
- Levine J, Barak Y, Chengappa KN, Rapoport A, Rebey M, Barak V (1999) Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology* 40:171-176.
- Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW (1998) The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1397-1403.
- Li XH, Gong JP, Tu B, Shi YJ, Liu CA (2003) In vivo expression of lipopolysaccharide binding protein and its gene induced by endotoxin. *Chin J Traumatol* 6:280-283.
- Liao J, Keiser JA, Scales WE, Kunkel SL, Kluger MJ (1995) Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 268:R699-R706.
- Liew FY, Liu H, Xu D (2005) A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. *Immunol Lett* 96:27-31.
- Lightman SL, Young WS (1988) Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 403:511-523.
- Lindvall K, Kahan T, de FU, Ostergren J, Hjemdahl P (1991) Stress-induced changes in blood pressure and left ventricular function in mild hypertension. *Clin Cardiol* 14:125-132.
- Lisi PJ, Chu CW, Koch GA, Endres S, Lonnemann G, Dinarello CA (1987) Development and use of a radioimmunoassay for human interleukin-1 beta. *Lymphokine Res* 6:229-244.
- Liu S, Zhu X, Liu Y, Wang C, Wang S, Tang X, Ni X (2011) Endotoxin tolerance of adrenal gland: attenuation of corticosterone production in response to lipopolysaccharide and adrenocorticotrophic hormone. *Crit Care Med* 39:518-526.
- Lopez JF, Vazquez DM, Chalmers DT, Watson SJ (1997) Regulation of 5-HT receptors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Implications for the neurobiology of suicide. *Ann N Y Acad Sci* 836:106-134.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S232-S240.

- Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 54:358-362.
- Mackowiak PA, Bartlett JG, Borden EC, Goldblum SE, Hasday JD, Munford RS, Nasraway SA, Stolley PD, Woodward TE (1997) Concepts of fever: recent advances and lingering dogma. *Clin Infect Dis* 25:119-138.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2001a) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem* 76:532-538.
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC (2001b) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24:420-429.
- Madrigal JL, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2002a) The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology* 26:155-163.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC (2002b) Stress-induced increase in extracellular sucrose space in rats is mediated by nitric oxide. *Brain Res* 938:87-91.
- Madrigal JL, Caso JR, De CJ, Cardenas A, Leza JC, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA (2003a) Effect of subacute and chronic immobilisation stress on the outcome of permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Brain Res* 979:137-145.
- Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC (2003b) Relationship between cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in rat cortex after stress. *Eur J Neurosci* 18:1701-1705.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC (2003c) Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28:1579-1588.
- Maes M, Song C, Lin A, De JR, Van GA, Kenis G, Bosmans E, De M, I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpe S, Smith RS (1998) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10:313-318.
- Maes M (1999) Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol* 461:25-46.
- Maes M, Kubera M, Leunis JC (2008) The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett* 29:117-124.
- Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer B, Maj M (2009) The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis* 24:27-53.
- Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14002-14008.
- Maier SF, Watkins LR (1998) Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev* 105:83-107.

- Martínez Calejman C, Astort F, Di Gruccio JM, Repetto EM, Mercau M, Giordanino E, Sanchez R, Pignataro O, Arias P, Cymeryng CB (2011) Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFkappaB-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Mol Cell Endocrinol* 337:1-6.
- Maruta E, Yabuuchi K, Nishiyori A, Takami S, Minami M, Satoh M (1997) Beta2-adrenoceptors on the glial cells mediate the induction of interleukin-1beta mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 49:291-294.
- Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Ostroff RB, Podd L (1986) Urinary free-cortisol levels in posttraumatic stress disorder patients. *J Nerv Ment Dis* 174:145-149.
- Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Li M (2011) TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol Pharmacol* 79:34-41.
- Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W (2002) Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut* 51:507-513.
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS (1968) Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220:911-912.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995) Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5:205-216.
- McEwen BS (2000) Stress, definition and concepts of.. In: *Encyclopedia of stress* pp 508-509. San Diego (CA, USA): Academic Press.
- McEwen BS, Magariños AM (2001) Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 16:S7-S19.
- McEwen BS (2005) Stressed or stressed out: what is the difference? *J Psychiatry Neurosci* 30:315-318.
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ (2000) The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:219-232.
- Meddings JB, Swain MG (2000) Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119:1019-1028.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Meyer SE, Chrousos GP, Gold PW (2001) Major depression and the stress system: a life span perspective. *Dev Psychopathol* 13:565-580.
- Meyers CA, Albitar M, Estey E (2005) Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 104:788-793.
- Michelson D, Stone L, Galliven E, Magiakou MA, Chrousos GP, Sternberg EM, Gold PW (1994) Multiple sclerosis is associated with alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J Clin Endocrinol Metab* 79:848-853.
- Mikova O, Yakimova R, Bosmans E, Kenis G, Maes M (2001) Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur Neuropsychopharmacol* 11:203-208.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65:732-741.

- Miller GE, Freedland KE, Carney RM (2005) Depressive symptoms and the regulation of proinflammatory cytokine expression in patients with coronary heart disease
18. *J Psychosom Res* 59:231-236.
- Mills KH (2011) TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 11:807-822.
- Minami M, Kuraishi Y, Yamaguchi T, Nakai S, Hirai Y, Satoh M (1991) Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 123:254-256.
- Mitchell PB, Parker GB, Gladstone GL, Wilhelm K, Austin MP (2003) Severity of stressful life events in first and subsequent episodes of depression: the relevance of depressive subtype. *J Affect Disord* 73:245-252.
- Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Kosugi A (2002) Essential role of MD-2 in B-cell responses to lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 distribution. *J Endotoxin Res* 8:449-452.
- Mizoguchi K, Kunishita T, Chui DH, Tabira T (1992) Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. *Neurosci Lett* 138:157-160.
- Modell S, Yassouridis A, Huber J, Holsboer F (1997) Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology* 65:216-222.
- Moghaddam B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650-1657.
- Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR (2006) Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 26:430-437.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR (1995) Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol* 6:682-687.
- Muller N, Schwarz MJ (2007) The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 12:988-1000.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3:667-672.
- Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, Hasko J, Krizbai IA (2010) Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int* 57:556-564.
- Nair SM, Werkman TR, Craig J, Finnell R, Joels M, Eberwine JH (1998) Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 18:2685-2696.
- Narumiya S, Ohno K, Fujiwara M, Fukushima M (1986) Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. II. Temperature-dependent transfer of a cyclopentenone prostaglandin to nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* 239:506-511.
- Narumiya S, Hirata N, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A (1993) Structure and function of prostanoid receptors. *J Lipid Mediat* 6:155-161.

- Necela BM, Su W, Thompson EA (2008) Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-kappaB in macrophages. *Immunology* 125:344-358.
- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342-1344.
- Nguyen KT, Deak T, Owens SM, Kohno T, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF (1998) Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci* 18:2239-2246.
- Norris PC, Reichart D, Dumlao DS, Glass CK, Dennis EA (2011) Specificity of eicosanoid production depends on the TLR-4-stimulated macrophage phenotype. *J Leukoc Biol* 90:563-574.
- Nukina H, Sudo N, Komaki G, Yu X, Mine K, Kubo C (1998) The restraint stress-induced elevation in plasma interleukin-6 negatively regulates the plasma TNF-alpha level. *Neuroimmunomodulation* 5:323-327.
- O'Connor KA, Johnson JD, Hansen MK, Wieseler Frank JL, Maksimova E, Watkins LR, Maier SF (2003) Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. *Brain Res* 991:123-132.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561.
- Olfe J, Domanska G, Schuett C, Kiank C (2010) Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness. *BMC Physiol* 10:2.
- Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC (2000) Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* 74:785-791.
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924.
- Olsson S, Sundler R (2006) The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol* 43:607-612.
- Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y (2003) Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 170:3977-3985.
- Owen BM, Eccleston D, Ferrier IN, Young AH (2001) Raised levels of plasma interleukin-1beta in major and postviral depression. *Acta Psychiatr Scand* 103:226-228.
- Owens MJ, Overstreet DH, Knight DL, Rezvani AH, Ritchie JC, Bissette G, Janowsky DS, Nemeroff CB (1991) Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a proposed animal model of depression with genetic muscarinic supersensitivity. *Neuropsychopharmacology* 4:87-93.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.
- Pariante CM, Miller AH (2001) Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 49:391-404.

- Paris J (2000) Predispositions, personality traits, and posttraumatic stress disorder. *Harv Rev Psychiatry* 8:175-183.
- Pavlidis C, Ogawa S, Kimura A, McEwen BS (1996) Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices. *Brain Res* 738:229-235.
- Pérez-Nievas BG, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Leza JC (2010) Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: mechanisms implicated. *J Neuroinflammation* 7:60.
- Pérez-Nievas BG, Hammerschmidt T, Kummer MP, Terwel D, Leza JC, Heneka MT (2011) Restraint stress increases neuroinflammation independently of amyloid beta levels in amyloid precursor protein/PS1 transgenic mice. *J Neurochem* 116:43-52.
- Peskind ER, Wilkinson CW, Petrie EC, Schellenberg GD, Raskind MA (2001) Increased CSF cortisol in AD is a function of APOE genotype. *Neurology* 56:1094-1098.
- Pfohl B, Sherman B, Schlechte J, Winokur G (1985) Differences in plasma ACTH and cortisol between depressed patients and normal controls. *Biol Psychiatry* 20:1055-1072.
- Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 52:201-243.
- Pirianov G, Waddington SN, Lindstrom TM, Terzidou V, Mehmet H, Bennett PR (2009) The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) delays lipopolysaccharide-induced preterm delivery and reduces mortality in the newborn mouse. *Endocrinology* 150:699-706.
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation
1. *Biochim Biophys Acta* 1813:1619-1633.
- Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB (1998) Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* 21:293-307.
- Poland RE, Cloak C, Lutchmansingh PJ, McCracken JT, Chang L, Ernst T (1999) Brain N-acetyl aspartate concentrations measured by H MRS are reduced in adult male rats subjected to perinatal stress: preliminary observations and hypothetical implications for neurodevelopmental disorders. *J Psychiatr Res* 33:41-51.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, Lizasoain I, Menchen P, Gomez-Lus ML, Lorenzo P, Cos E, Leza JC, Menchen L (2007) The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* 132:1791-1803.
- Porsolt RD, Le PM, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutmacher I, Wolter K, Piesche M, Schroers R, Weiss E, Kirschning CJ, Rochford CD, Bruck W, Becher B (2006) Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:456-464.
- Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM (1999) The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 5:1178-1182.

- Rachal PC, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW (2001) The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1 β . *Neurosci Biobehav Rev* 25:29-41.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006) Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26:12967-12976.
- Raison CL, Miller AH (2003) When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* 160:1554-1565.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 27:24-31.
- Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, McInerney SC, Macklin ML, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK (2000) Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biol Psychiatry* 47:769-776.
- Reder AT, Makowiec RL, Lowy MT (1994) Adrenal size is increased in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51:151-154.
- Renault PF, Hoofnagle JH, Park Y, Mullen KD, Peters M, Jones DB, Rustgi V, Jones EA (1987) Psychiatric complications of long-term interferon alfa therapy. *Arch Intern Med* 147:1577-1580.
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.
- Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711-1723.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82.
- Rock JP, Oldfield EH, Schulte HM, Gold PW, Kornblith PL, Loriaux L, Chrousos GP (1984) Corticotropin releasing factor administered into the ventricular CSF stimulates the pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 323:365-368.
- Rajo L, Conesa L, Bermudez O, Livianos L (2006) Influence of stress in the onset of eating disorders: data from a two-stage epidemiologic controlled study. *Psychosom Med* 68:628-635.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000a) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403:103-108.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000b) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rousseaux C, Desreumaux P (2006) [The peroxisome-proliferator-activated gamma receptor and chronic inflammatory bowel disease (PPAR γ and IBD)]. *J Soc Biol* 200:121-131.
- Ruddle NH (1992) Tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β). *Curr Opin Immunol* 4:327-332.
- Sapolsky RM (1985) A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J Neurosci* 5:1228-1232.
- Sapolsky RM, Pulsinelli WA (1985) Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229:1397-1400.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.

- Sapolsky RM (1996) Why stress is bad for your brain. *Science* 273:749-750.
- Sapolsky RM (1998) The stress of Gulf War syndrome. *Nature* 393:308-309.
- Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)* 78:3-13.
- Sawchenko PE (1987) Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 403:213-223.
- Scher JU, Pillinger MH (2005) 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114:100-109.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419.
- Seckl JR, Dickson KL, Fink G (1990) Central 5,7-dihydroxytryptamine lesions decrease hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic Acid expression. *J Neuroendocrinol* 2:911-916.
- Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138:32.
- Selye H (1976) Further thoughts on "stress without distress". *Med Times* 104:124-144.
- Seong SY, Matzinger P (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4:469-478.
- Sha T, Sunamoto M, Kitazaki T, Sato J, Li M, Iizawa Y (2007) Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur J Pharmacol* 571:231-239.
- Shang L, Fukata M, Thirunarayanan N, Martin AP, Arnaboldi P, Maussang D, Berin C, Unkeless JC, Mayer L, Abreu MT, Lira SA (2008) Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology* 135:529-538.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782.
- Shin LM, McNally RJ, Kosslyn SM, Thompson WL, Rauch SL, Alpert NM, Metzger LJ, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK (1999) Regional cerebral blood flow during script-driven imagery in childhood sexual abuse-related PTSD: A PET investigation. *Am J Psychiatry* 156:575-584.
- Shintani F, Nakaki T, Kanba S, Kato R, Asai M (1995) Role of interleukin-1 in stress responses. A putative neurotransmitter. *Mol Neurobiol* 10:47-71.
- Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA (1999) Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1944-1948.
- Singh AK, Jiang Y (2004) How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology* 201:197-207.
- Sinyor M, Schaffer A, Levitt A (2010) The sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D) trial: a review. *Can J Psychiatry* 55:126-135.
- Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275:4670-4678.

- Sorrells SF, Sapolsky RM (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun* 21:259-272.
- Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation
- Soufer R, Jain H, Yoon AJ (2009) Heart-brain interactions in mental stress-induced myocardial ischemia. *Curr Cardiol Rep* 11:133-140.
- Spencer RL, Young EA, Choo PH, McEwen BS (1990) Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of in vivo receptor number, occupancy, and activation with varying level of steroid. *Brain Res* 514:37-48.
- Staubli U, Xu FB (1995) Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J Neurosci* 15:2445-2452.
- Sterner EY, Kalynchuk LE (2010) Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:777-790.
- Stratakis CA, Chrousos GP (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* 771:1-18.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4844-4849.
- Streng H (2001) [The relationship between psychological stress and the clinical course of multiple sclerosis. An update]. *Psychother Psychosom Med Psychol* 51:166-175.
- Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC (1993) NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259:1912-1915.
- Sun SC, Ganchi PA, Beraud C, Ballard DW, Greene WC (1994) Autoregulation of the NF-kappa B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1346-1350.
- Szabo C (2003) Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 140-141:105-112.
- Tafet GE, Bernardini R (2003) Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:893-903.
- Tagay S, Schlegl S, Senf W (2010) Traumatic events, posttraumatic stress symptomatology and somatoform symptoms in eating disorder patients. *Eur Eat Disord Rev* 18:124-132.
- Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, da Cunha AA, Dalmaz C, Wyse AT (2011) Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochem Res* 36:487-493.
- Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K (2006) Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* 129:3006-3019.
- Takadera T, Yumoto H, Tozuka Y, Ohyashiki T (2002) Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett* 317:61-64.
- Takaki A, Huang QH, Somogyvari-Vigh A, Arimura A (1994) Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *Neuroimmunomodulation* 1:335-342.

- Takashima K, Matsunaga N, Yoshimatsu M, Hazeki K, Kaisho T, Uekata M, Hazeki O, Akira S, Iizawa Y, Ii M (2009) Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol* 157:1250-1262.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Takeda K, Akira S (2007) Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14:Unit.
- Takeuchi O, Akira S (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 1:625-635.
- Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol* 213:114-121.
- Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RA, Updegraff JA (2000) Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev* 107:411-429.
- Tegethoff M, Greene N, Olsen J, Schaffner E, Meinschmidt G (2011) Stress during pregnancy and offspring pediatric disease: A National Cohort Study. *Environ Health Perspect* 119:1647-1652.
- Telner JL, Singhal RL (1984) Psychiatric progress. The learned helplessness model of depression. *J Psychiatr Res* 18:207-215.
- Tobias PS, Mathison J, Mintz D, Lee JD, Kravchenko V, Kato K, Pugin J, Ulevitch RJ (1992) Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:239-245.
- Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ (1995) Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 270:10482-10488.
- Tombaugh GC, Sapolsky RM (1992) Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res* 588:154-158.
- Tombaugh GC, Yang SH, Swanson RA, Sapolsky RM (1992) Glucocorticoids exacerbate hypoxic and hypoglycemic hippocampal injury in vitro: biochemical correlates and a role for astrocytes. *J Neurochem* 59:137-146.
- Tomozawa Y, Inoue T, Satoh M (1995) Expression of type I interleukin-1 receptor mRNA and its regulation in cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 195:57-60.
- Tornello S, Orti E, De Nicola AF, Rainbow TC, McEwen BS (1982) Regulation of glucocorticoid receptors in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 35:411-417.
- Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 115:2603-2611.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 163:28-40.
- Tsan MF, Gao B (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76:514-519.

- Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A (2002) Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:535-556.
- Vaidya VA (2000) Stress, depression and hippocampal damage. *J Biosci* 25:123-124.
- Vakharia K, Hinson JP (2005) Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Endocrinology* 146:1398-1402.
- Valentino RJ, Foote SL, Page ME (1993) The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann N Y Acad Sci* 697:173-188.
- Van Eekelen JA, Rots NY, Sutanto W, de Kloet ER (1992) The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the brown Norway rat. *Neurobiol Aging* 13:159-170.
- Van Gool J, Van Vugt H, Helle M, Aarden LA (1990) The relation among stress, adrenalin, interleukin 6 and acute phase proteins in the rat. *Clin Immunol Immunopathol* 57:200-210.
- Velders GA, van OR, Hagoort H, Verzaal P, Guiot HF, Lindley IJ, Willemze R, Opdenakker G, Fibbe WE (2004) Reduced stem cell mobilization in mice receiving antibiotic modulation of the intestinal flora: involvement of endotoxins as cofactors in mobilization. *Blood* 103:340-346.
- Vingerhoets AJ (1985) The role of the parasympathetic division of the autonomic nervous system in stress and the emotions. *Int J Psychosom* 32:28-34.
- Wan Y, Freeswick PD, Khemlani LS, Kispert PH, Wang SC, Su GL, Billiar TR (1995) Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect Immun* 63:2435-2442.
- Wang CX, Shuaib A (2002) Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 67:161-172.
- Wang YC, Lin S, Yang QW (2011) Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *J Neuroinflammation* 8:134.
- Weiner MF, Vobach S, Olsson K, Svetlik D, Risser RC (1997) Cortisol secretion and Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry* 42:1030-1038.
- Whitnall MH (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629.
- Wilckens T, De Rijk R (1997) Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today* 18:418-424.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93:358-364.
- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134:319-329.
- Wira CR, Sandoe CP, Steele MG (1990) Glucocorticoid regulation of the humoral immune system. I. In vivo effects of dexamethasone on IgA and IgG in serum and at mucosal surfaces. *J Immunol* 144:142-146.

- Wood GE, Shors TJ (1998) Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4066-4071.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269:4705-4708.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386.
- Yamasu K, Shimada Y, Sakaizumi M, Soma G, Mizuno D (1992) Activation of the systemic production of tumor necrosis factor after exposure to acute stress. *Eur Cytokine Netw* 3:391-398.
- Yehuda R, Kahana B, Binder-Brynes K, Southwick SM, Mason JW, Giller EL (1995) Low urinary cortisol excretion in Holocaust survivors with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 152:982-986.
- Yehuda R, Siever LJ, Teicher MH, Levengood RA, Gerber DK, Schmeidler J, Yang RK (1998) Plasma norepinephrine and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol concentrations and severity of depression in combat posttraumatic stress disorder and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 44:56-63.
- Yehuda R (2002a) Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatr Clin North Am* 25:341-68, vii.
- Yehuda R (2002b) Post-traumatic stress disorder. *N Engl J Med* 346:108-114.
- Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, Papewalis C, Schulze-Osthoff K, Knuefermann P, Zahringer U, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Bornstein SR (2006) Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6392-6397.
- Zhang X, Young HA (2002) PPAR and immune system--what do we know? *Int Immunopharmacol* 2:1029-1044.
- Zhang Y, Woodruff M, Zhang Y, Miao J, Hanley G, Stuart C, Zeng X, Prabhakar S, Moorman J, Zhao B, Yin D (2008) Toll-like receptor 4 mediates chronic restraint stress-induced immune suppression. *J Neuroimmunol* 194:115-122.
- Zhou D, Kusnecov AW, Shurin MR, DePaoli M, Rabin BS (1993) Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 133:2523-2530.
- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY (2007) Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843-1854.
- Zoppi S, Perez Nieves BG, Madrigal JL, Manzanares J, Leza JC, Garcia-Bueno B (2011) Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 36:805-818.